Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

MORPHOLOGISCHE UND ZYTOCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN DES PERIPHEREN DIFFERENTIALBLUTBILDES AUS EDTA-BLUT

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ANNEBÄRBEL HÜTHER-FRANCKENBERG, geb. Hüther
aus Freiburg

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

MORPHOLOGISCHE UND ZYTOCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN DES PERIPHEREN DIFFERENTIALBLUTBILDES AUS EDTA-BLUT

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ANNEBÄRBEL HÜTHER-FRANCKENBERG, geb. Hüther
aus Freiburg

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 22.9.1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent:	Prof. Dr. med. D. Klaus
Correferent:	Prof. Dr. med. dent. G. Ahrens

All' denen, die regen Anteil an

meiner Doktorarbeit genommen haben .....

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0077

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Automatisierung in der Zellzählung	1
1.2.	Antikoagulantien	1
1.2.1.	Oxalat- und Zitratsalze	1
1.2.2.	Heparin	1
1.2.3.	Aethylendiamintetraessigsäure = EDTA	2
1.3.	Problemstellung	2
2.	Methodik	4
2.1.	Patientengut	4
2.2.	Blutabnahme und Ausstriche	4
2.3.	Lagerungszeit und -temperatur	5
2.4.	Färbungen	5
2.4.1.	Panoptische Färbung nach PAPPENHEIM	5
2.4.2.	PAS-Färbung nach Mc MANUS	5
2.4.3.	Sudanschwarz-B-Färbung nach SHEEHAN und STOREY	6
2.5.	Auswertung der Ausstriche	7
3.	Ergebnisse	9
3.1.	Vorversuche	9
3.1.1.	$4^{o}C$	9
3.1.2.	Zimmertemperatur	9
3.1.3.	$37^{o}C$	12
3.1.4.	Schlußfolgerung	12
3.2.	Normale Blutbilder	15
3.2.1.	Zellverteilung	15
3.2.2.	Zellmorphologie	18
3.2.2.1.	Basophile segmentkernige Granulozyten	18
3.2.2.2.	Eosinophile segmentkernige Granulozyten	18
3.2.2.3.	Neutrophile segmentkernige Granulozyten	19
3.2.2.4.	Lymphozyten	19
3.2.2.5.	Monozyten	2o
3.2.2.6.	Zerstörte Zellen	2o

Seite

3.3. Blutbilder bei Virusinfekten 2o
3.3.1. Zellverteilung 2o
3.3.2. Zellmorphologie 21
3.4. Blutbilder myeloproliferativer Erkrankungen 21
3.4.1. Chronisch myeloische Leukämie 22
3.4.1.1. Zellverteilung 22
3.4.1.2. Zellmorphologie 22
3.4.2. Chronisch lymphatische Leukämie 23
3.4.2.1. Zellverteilung 23
3.4.2.2. Zellmorphologie 23
3.4.3. Maligne Lymphome 23
3.4.3.1. Zellverteilung 24
3.4.3.2. Zellmorphologie 24
3.4.4. Plasmozytom 24
3.4.4.1. Zellverteilung 24
3.4.4.2. Zellmorphologie 25
3.4.5. Polycythaemia vera 25
3.4.5.1. Zellverteilung 25
3.4.5.2. Zellmorphologie 25
3.4.6. Osteomyelofibrose / Gluthationreduktasemangel 25
3.4.6.1. Zellverteilung 25
3.4.6.2. Zellmorphologie 26
3.4.7. Blutbilder unter Zytostatika-Therapie 26
3.4.8. Leukozytenzählung im Coulter Counter 32
3.5. Zytochemie 34
3.5.1. PAS-Färbung 34
3.5.1.1. Kapillares und venöses Blutbild 34
3.5.1.2. Grad der PAS-Positivität 34
3.5.1.3. Art der Anfärbung 34
3.5.2. Sudanschwarz-B-Färbung 34
3.5.2.1. Kapillares und venöses Blutbild 35
3.5.2.2. Grad der Anfärbung 35
3.5.2.3. Art der Anfärbung 35

		Seite
4.	Diskussion	38
4.1.	Problematik	38
4.2.	Kapillar- und Venenblutausstrich	38
4.3.	Lagerungstemperatur	39
4.4.	Zellverteilung	41
4.5.	Zellmorphologie	43
4.6.	Zytochemie: PAS- und Sudanschwarz-B-Färbung	48
4.7.	EDTA als Ursache für morphologische und zytochemische Veränderungen	52
5.	Bildteil	53
6.	Zusammenfassung	57
7.	Literaturverzeichnis	59

1. Einleitung

1.1. Automatisierung in der Zellzählung

Mit Hilfe elektronischer Zählgeräte können heute in kürzester Zeit Erythrozyten, Hämatokrit (HK) und nach Hämolyse Leukozyten (4) gemessen und mittleres Zellvolumen (MCV), mittleres Hämoglobin des Einzelerythrozyten (Hb_E) und die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) errechnet werden. Das Prinzip dieser automatisierten Zellzählung, wie es beispielsweise im Gerät der Firma Coulter Electronics GmbH angewandt wird, basiert auf einem Gleichstromfeld, das durch die unterschiedliche Größe der vorbeifließenden Partikel verändert wird (28). Voraussetzung für den Einsatz aller dieser Geräte ist, daß die Blutproben ungerinnbar gemacht werden können, möglichst ohne schwerwiegende morphologische und metabolische Veränderungen hervorzurufen. Hierfür bieten sich verschiedene Antikoagulantien an, die auf unterschiedliche Weise in das Gerinnungssystem eingreifen.

1.2. Antikoagulantien

1.2.1. Zitrat- und Oxalatsalze

Zitrat- und Oxalatsalze bilden mit den Ca^{++}-Ionen des Blutplasmas Komplexe und machen es so gerinnungsunfähig (22). Die Meinungen bezüglich der Wirkung dieser beiden Antikoagulantien auf die Leukozyten gehen auseinander. Einerseits soll der Zellmetabolismus eingeschränkt werden, andererseits werden mit Leukozytenanreicherungen aus Oxalat- und Zitratblut erfolgreiche biochemische Studien durchgeführt (2).

1.2.2. Heparin

Heparin hemmt auf Grund seiner Antithrombinwirkung die

Gerinnung (22). Für die Anwendung im Coulter-Counter-Gerät wurde es bisher nicht eingesetzt. Nicht nur der Preis wird dabei eine Rolle spielen (25), sondern auch die Tatsache, daß Thrombozyten unter Heparineinfluß leicht verklumpen (2).

1.2.3. Aethylendiamintetraessigsäure = EDTA

Das Kaliumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure (K-EDTA) ist das heute am meisten verwandte Antikoagulans für die Untersuchungen in hämatologischen Laboratorien (21). Als Chelatbildner entzieht es dem Blut Ca^{++}-Ionen und macht es so ungerinnbar. Man benutzt es in Konzentrationen von 1 mg/ml, bei der eine Koagulation verhindert wird, ohne daß es durch Osmose zu Veränderungen der Zellvolumina kommt (7). Für die Bestimmungen im Coulter Counter wird K-EDTA in kristalliner Form als weißes Pulver in 4-ml-Röhrchen angewandt, in denen das venöse Blut sofort aufgefangen wird. Das Pulver löst sich bei behutsamem Wenden des Röhrchens innerhalb von 5-1o sec (1o). Eine Schaumbildung durch zu starkes Schütteln muß wegen der Gefahr einer Hämolyse der Erythrozyten vermieden werden. Da die Zellen im K-EDTA-Blut besser als im Oxalatblut erhalten werden, das Antikoagulans sich leicht löst und obendrein noch verhältnismäßig billig ist, wird es bei der routinemäßigen Blutabnahme für hämatologische Untersuchungsverfahren benutzt (1o, 25).

1.3. Problemstellung

Auf Grund der Tatsache, daß heute im Zuge der Rationalisierung Differentialblutbilder meist aus EDTA-Blut angefertigt werden, stellen sich folgende Fragen:

a) Sind auch Differentialblutbilder aus länger gelagertem Blut - bis zu 24 Std. - für die Diagnostik brauchbar ?

b) Ändert das K-EDTA eventuell Morphologie und Metabolis-

mus der Leukozyten und beeinflußt so das Differentialblutbild ?

c) Kann K-EDTA-Blut auch zu zytochemischen Untersuchungen wie PAS- und Sudanschwarz-B-Färbung, mit deren Hilfe u.a. versucht wird, die akuten Leukämien zu klassifizieren (24), verwendet werden ?

d) Sind die Ergebnisse aus frischem Kapillarblut dieselben wie aus K-EDTA-Blut, das bis zu 24 Std. gelagert wurde, bzw. welche Änderungen sind mit zunehmender Lagerungsdauer zu erwarten ?

2. Methodik

2.1. Patientengut

Für die Versuche wurde Blut von Patienten der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg - Männer und Frauen ungefähr im Verhältnis 1 : 1 im Alter von 24 bis 81 Jahren - untersucht. Im einzelnen wurden folgende Gruppen daraus gebildet:

A. Patienten ohne Veränderungen des Differentialblutbildes, d. h. hämatologisch gesunde.

B. Patienten mit Virusinfekten.

C. Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen, die nochmals in eine Gruppe
   a) mit Zytostatika-Therapie
   und eine weitere
   b) ohne Zytostatika-Therapie unterteilt wurden.

2.2. Blutabnahme und Ausstriche

Zum Vergleich wurde sowohl Venen- als auch Kapillarblut entnommen. Das venöse Blut wurde von jedem Patienten aus einer Armvene in mit K-EDTA beschichtete Kunststoffröhrchen (4 ml Inhalt) aufgefangen, die zu ca. 3/4 gefüllt und dann zur vollständigen Durchmischung verschlossen kurz gewendet wurden.
Das Kapillarblut entnahmen wir aus dem Ohrläppchen nach Desinfektion der Hautoberfläche mit 7o % igem Alkohol. Der erste Bluttropfen wurde verworfen und der nächste auf einem Objektträger aufgefangen und sofort ausgestrichen.
Auch von dem EDTA-Blut wurde ein Ausstrich sofort angefertigt. Er wurde so ausgeführt, daß er die für die Differenzierung geeignete Fahne aufwies.

2.3. Lagerungszeit und -temperatur

Für die Vorversuche wurden von jedem Patienten drei Röhrchen abgenommen, wobei das erste im Kühlschrank bei 4° C, das zweite bei Zimmertemperatur und das dritte im Wärmebad bei 37° C aufbewahrt wurden. Wir wählten diese drei Temperaturen aus folgenden Gründen: 4° C als Versuch einer Art Konservierung, Zimmertemperatur, weil die EDTA-Röhrchen meist bei Zimmertemperatur bis zur Zellzählung im Coulter Counter bzw. zur Anfertigung der Ausstriche gelagert werden und 37° C, um das Blut bei physiologischer Temperatur zu halten. Die Ausstriche wurden dann nach 3, 6 und 24 Std. angefertigt, die luftgetrocknet, unfixiert und ungefärbt zunächst gesammelt und später zusammen gefärbt wurden, um färberisch bedingte Unterschiede zu vermeiden bzw. erkennen zu können.

2.4. Färbungen

2.4.1. Panoptische Färbung nach PAPPENHEIM (23)

Diese Färbung ist eine Kombination der Färbungen von JENNER, MAY, GRÜNWALD und GIEMSA, mit der die Morphologie der Blutzellen, besonders die der Leukozyten, mikroskopisch untersucht werden kann (4).

2.4.2. PAS-Färbung = Perjod Acidum Schiff nach Mc MANUS (23)

Für alle Färbungen wurde wegen ihrer langen Haltbarkeit die gleiche PAS-Stammlösung verwandt.
Schiffsches Reagenz: o,5 g Para-Rosanilin werden in 15 ml 1n HCl ohne Erwärmung gelöst; o,5 g Kaliummetabisulfid werden in 85 ml Aqua dest. gelöst und zugesetzt. Die entstehende rötliche Lösung wird nach 24 Std. filtriert, bis das Filtrat wasserklar ist. Direkt vor dem Gebrauch werden angesetzt:

1. Perjodsäure: 1 g Perjodat wird mit 1oo ml Aqua dest. gemischt, bis sich alles aufgelöst hat. Dazu wird

o,8 ml Salpetersäure geschüttet.

2. Spülflüssigkeit: 1 g Kaliummetabisulfid wird im Becherglas mit 2o ml 1n HCl umgerührt, bis alles gelöst ist. 36o ml Aqua dest. werden dann mit der Lösung vermischt und auf 3 Färbeschalen verteilt.

Die luftgetrockneten Ausstriche werden 1o Minuten in Formalindampf fixiert und anschließend mit Aqua dest. abgespült. Für jeweils 1o Minuten werden sie erst in die Perjodsäure und dann unter fließendes Leitungswasser gestellt. Nach Spülen mit Aqua dest. werden die Ausstriche 3o Minuten mit Schiffschem Reagenz gefärbt. Nun werden sie dreimal schnell mit der frischen Kaliummetabisulfidlösung gespült, wieder für 2o Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt und mit Aqua dest. abgespült. In der aufsteigenden Alkoholreihe werden sie für 1-2 Minuten mit 7o %igem, 5 Minuten mit 96 %igem und nochmals 5 Minuten mit absolutem Alkohol entwässert. Dann werden sie 5 Minuten in Xylol getaucht und zum Schluß mit Caedax eingedeckt.

2.4.3. Sudanschwarz-B-Färbung nach SHEEHAN und STOREY (23)

Sudanschwarz-B: o,3 g Sudanschwarz-B in 1oo ml absolutem Alkohol vollständig lösen, Dauer ca. 1-2 Tage bis vollständig gelöst, häufig schütteln.
Pufferlösung: 16 g Phenol in 3o ml absolutem Alkohol und o,3 g hydriertes Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 x 12 H_2O) in 1oo ml Aqua dest. lösen, jede Lösung gut schütteln.
Vor Gebrauch werden 6o ml der Sudanschwarzlösung mit 6o ml der Pufferlösung gemischt und filtriert. Die Mischung zeigt eine neutrale bis leicht alkalische Reaktion. Phenolzugabe macht die Granula besser sichtbar.
Die luftgetrockneten Präparate werden in Formalindampf 5 Minuten fixiert, dann 1 Minute mit Leitungswasser abgespült und erneut luftgetrocknet. Nun werden sie für ca.

3o-45 Minuten in das Sudanschwarz-Pufferlösungsgemisch gestellt, anschließend mit 7o % igem Alkohol kurz gewaschen und mit einer normal angesetzten Giemsalösung (1 ml Aqua dest. auf 1 Tropfen Giemsastammlösung) gegengefärbt. Schließlich werden die Ausstriche luftgetrocknet.

2.5. Auswertung der Ausstriche

In jedem Ausstrich wurden 1oo Leukozyten ausgezählt. Die Zählung begann am Ausstrichende und wurde mäanderförmig fortgesetzt.
Bei der panoptischen Färbung wurden die 1oo Zellen aufgeteilt in: Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, jugendliche, stabkernige und segmentkernige neutrophile Granulozyten, eosinophile und basophile segmentkernige Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Bei den Ausstrichen, deren Blut 24 Std. gelagert wurde, wurden in einer zusätzlichen Zählung auch die zerstörten Zellen, d.h. die Kernschatten, mitgezählt.
Bei der PAS-Färbung wurden von den PAS-negativen Zellen = 0 die PAS-positiven unterschieden, die je nach Intensität der Färbung in entweder
1: schwach fokal angefärbte oder
1: schwach diffus angefärbte
2: mittelstark diffus angefärbte
3: stark diffus angefärbte unterteilt wurden. Der Maximalindex von 3oo war erreicht, wenn alle 1oo ausgezählten Zellen stark diffus angefärbt waren. Da die Ausstriche vom Blut Gesunder gemacht wurden, waren also die PAS-positiven Zellen zu ca. 95 % neutrophile segmentkernige Granulozyten (s. auch Diskussion). Deshalb hielten wir die Einteilung von HAYHOE et al. (13), der die PAS-Positivität in den granulozytären Vorstufen nach granulärer oder diffuser Reaktion beurteilt, für unsere Untersuchungen nicht für sinnvoll.

Die Sudanschwarz-B-gefärbten Präparate wurden mit Hilfe der Schätzmethode nach HAYHOE et al. (13) ausgewertet. Danach werden die Zellen (vorwiegend neutrophile segmentkernige, falls vorhanden auch eosinophile segmentkernige Granulozyten und vereinzelt Monozyten) je nach Intensität der Färbung den Reaktionsgraden 0 bis 3 zugeordnet.

0: Zellen ohne Granulafärbung
1: schwach positive abgrenzbare Granula
2: stark positive abgrenzbare Granula
3: starke allgemeine Sudanophilie.

Bei einem Maximalindex von 300 waren also alle 100 Leukozyten stark sudanophil.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche

In den Vorversuchen wollten wir die günstigste Aufbewahrungstemperatur von EDTA-Blutproben testen. Das Differentialblutbild, das je nach 3, 6 und 24 Std. angefertigt wurde, sollte sowohl möglichst geringe morphologische Veränderungen als auch kaum zerstörte Zellen aufweisen.
Von 1o Probanden - unterschiedlichen Geschlechtes und Alters - wurde jeweils venöses Blut in 3 EDTA beschichtete Kunststoffröhrchen aufgefangen und zum Vergleich ein Kapillarblutausstrich angefertigt (vgl. Abschnitt 2.3.). Die Auswertung der nach PAPPENHEIM gefärbten Ausstriche ergab folgendes Bild:

3.1.1. 4^{o} C

Im Laufe der Lagerungszeit nahm die relative Zahl der Lymphozyten und neutrophilen stabkernigen Granulozyten zu, während die aller anderen Zellformen abnahm (s. Abb. 1). Die Zellen selbst hatten vereinzelt Vakuolen im Zytoplasma, und ihre Kerne waren verklumpt und teilweise auch schon karyolytisch. Die ersten morphologischen Veränderungen waren schon nach 3 Std. Lagerung sichtbar und häuften sich, je länger das Blut vor Anfertigung der Ausstriche gelagert war. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Zellformen folgt in Abschnitt 3.2. Nach 24 Std. betrug der Prozentsatz der Zellen mit Zeichen der Karyolyse 3-11 % (s. Abb. 4).

3.1.2. Zimmertemperatur

Auch hier stieg die relative Zahl der Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten an. Der Anstieg war stärker als bei Blut, das bei 4^{o} C gelagert worden war (s. Abb. 2).

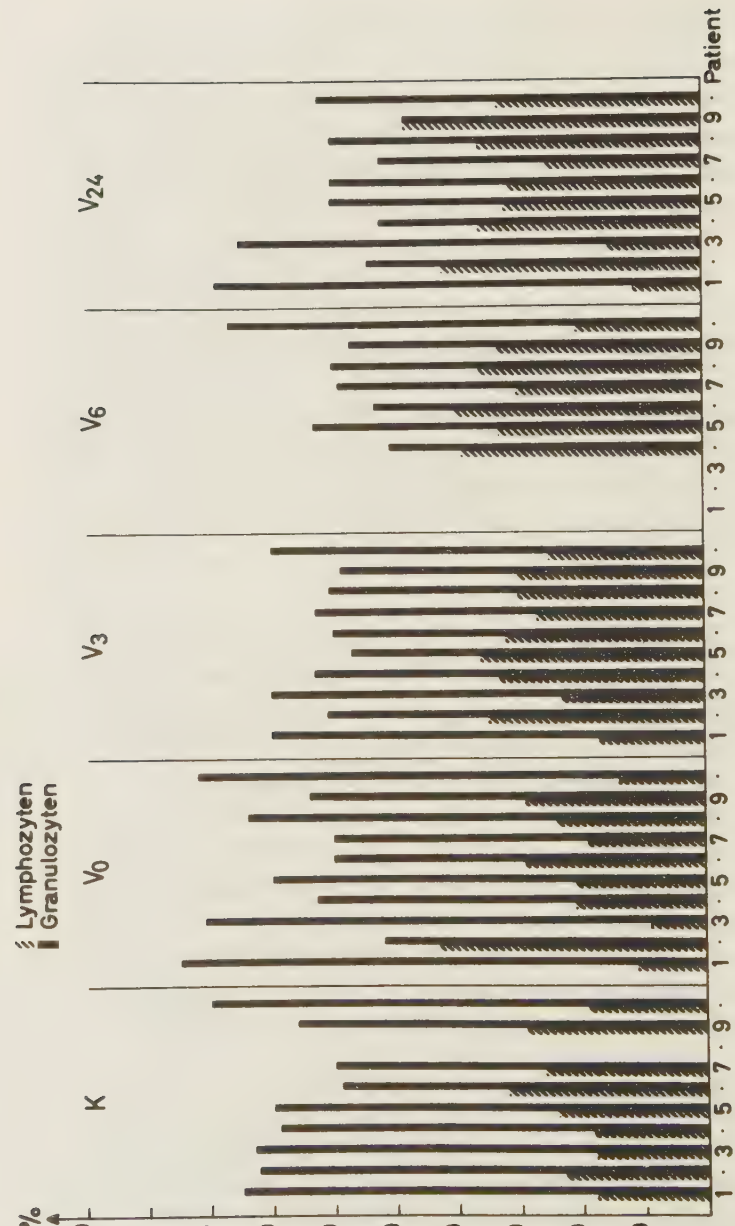

Abb. 1: Prozentuale Verteilung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Differentialblutbild nach Lagerung des venösen K-EDTA-Blutes (V) bei 4° C - Lagerzeit o, 3, 6 und 24 Std. - im Vergleich zum Kapillarblut (K).

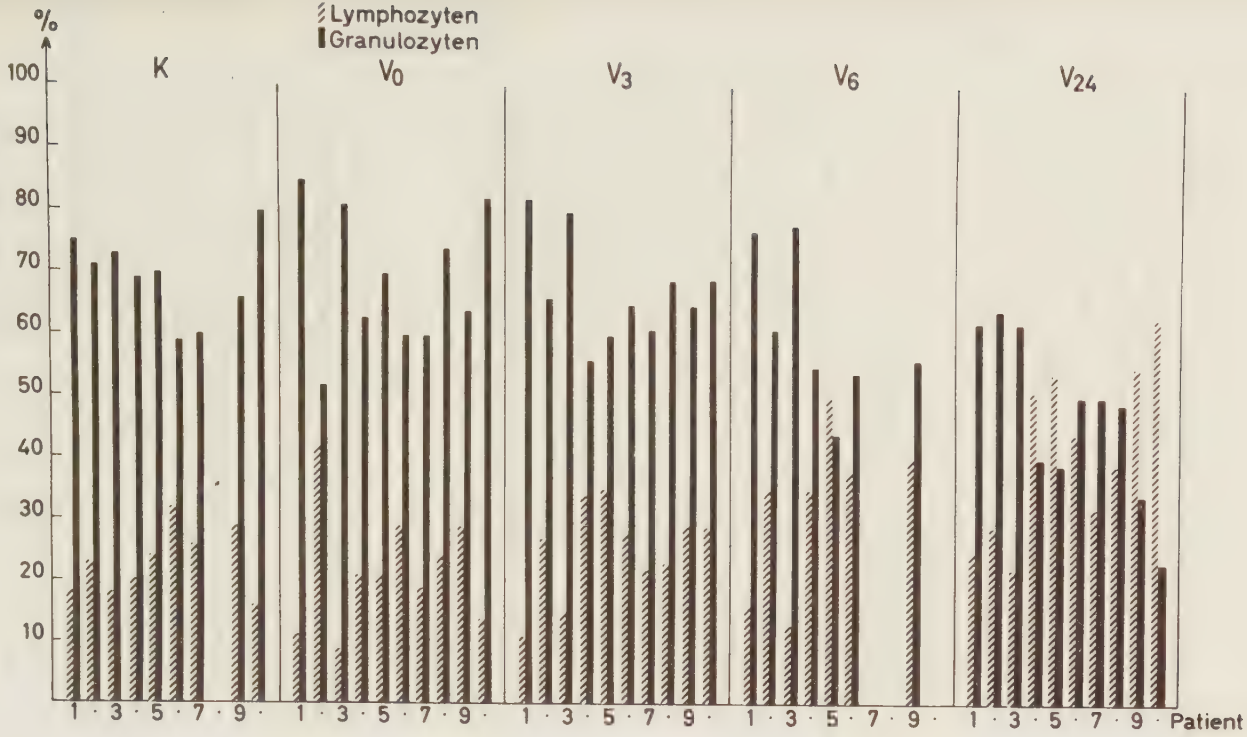

Abb. 2: Prozentuale Verteilung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Differentialblutbild nach Lagerung des venösen K-EDTA-Blutes (V) bei Zimmertemperatur - Lagerzeit o, 3, 6 und 24 Std. - im Vergleich zum Kapillarblut (K).

Außerdem hatten die Zellen bereits nach 3 Std. wesentlich häufiger Vakuolen im Zytoplasma. Dazu verklumpten die Zellkerne leichter und zerfielen eher. Diese Merkmale häuften sich mit zunehmender Lagerungsdauer und waren deshalb besonders stark in den Ausstrichen nach 24 Std. zu finden-verglichen mit den zeitlich gleichen der bei 4°C gelagerten Blutröhrchen. Zusätzlich stieg die Zahl der Zellen mit Karyolyse auf 11-3o % (s. Abb. 4).

3.1.3. 37°C

Der relative Anstieg der Lymphozyten und neutrophilen stabkernigen Granulozyten während der Lagerungszeit verbunden mit einer relativen Abnahme aller anderen Zellformen war hier besonders deutlich (s. Abb. 3). Dazu kamen vermehrte morphologische Veränderungen. Die nach 3 Std. angefertigten Ausstriche besaßen bereits so viele Zellen mit Vakuolen im Zytoplasma, wie wir sie bei dem bei 4°C gelagerten Blut erst etwa in den Ausstrichen nach 6 Std. fanden. Auch die Zellkerne zeigten früher Degenerationserscheinungen und zerfielen häufiger, so daß hier der Prozentsatz der karyolytischen Zellen bei 22-57 % lag (s. Abb. 4).

3.1.4. Schlußfolgerung

Mit steigender Lagerungstemperatur veränderten sich die Zellen im EDTA-Blut öfter und zeigten eher nekrobiotische Charakteristika, so daß sie für die Auswertung des Differentialblutbildes verlorengingen bzw. zu artifiziellen Verschiebungen führten. Die geringsten morphologischen Veränderungen erhielten wir bei den bei 4°C gelagerten Blutproben. Hier war auch die relative Verteilung der Zellen im Differentialblutbild im Vergleich zu der des Ausgangswertes und der der bei Zimmertemperatur und 37°C aufbewahrten Proben am wenigsten verändert (Vergleich der Abb. 1, 2 und 3).

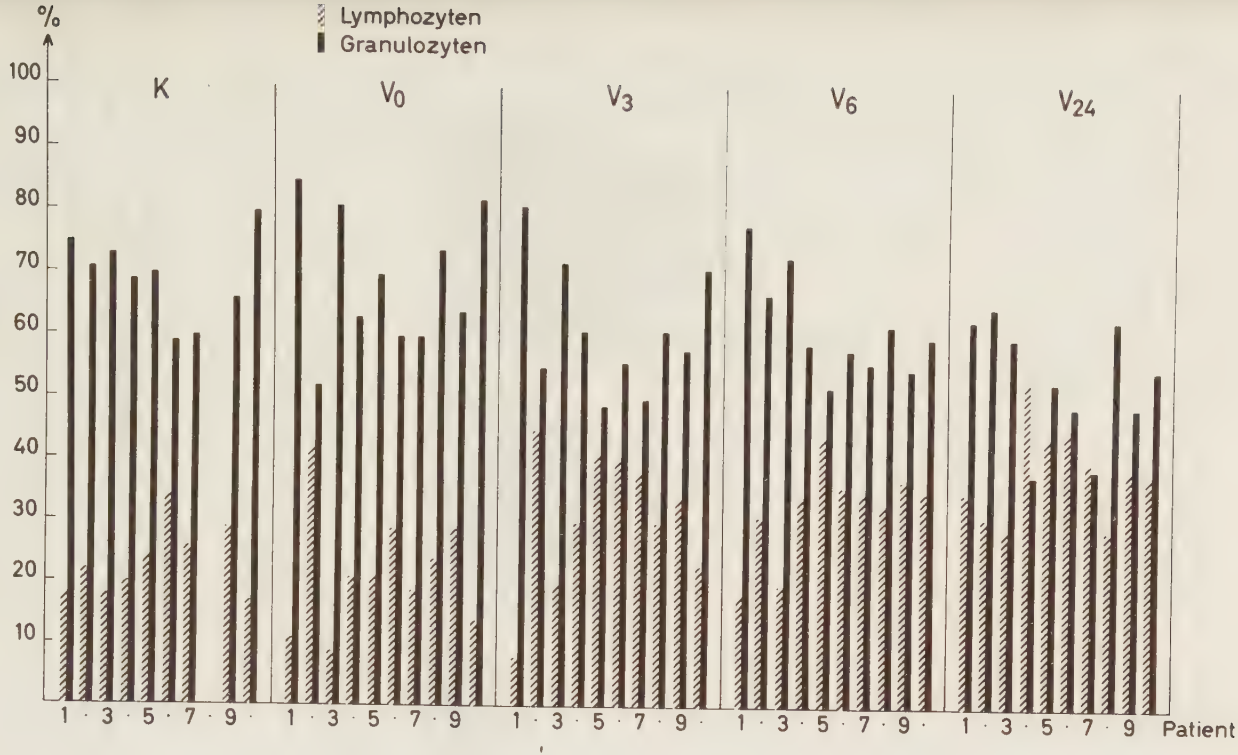

Abb. 3: Prozentuale Verteilung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Differentialblutbild nach Lagerung des venösen K-EDTA-Blutes (V) bei 37° C - Lagerzeit o, 3, 6 und 24 Std. - im Vergleich zum Kapillarblut (K).

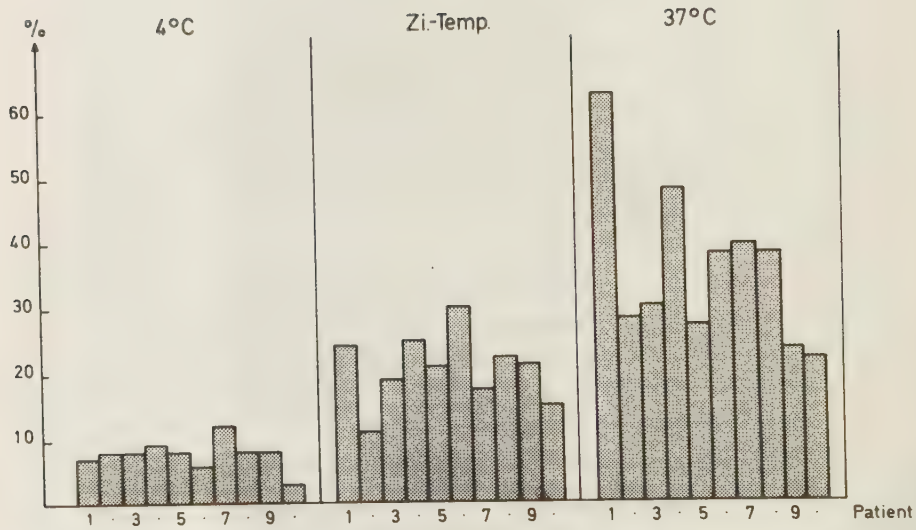

Abb. 4: Zerstörte Leukozyten in % nach 24 Std. Lagerung bei 4° C Zimmertemperatur und 37°.

Aus den Tabellen 1a-c ist die Änderung der prozentualen Verteilung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten nach 24 Std. in bezug auf den Zeitpunkt t = o Std. zu sehen. Die Werte schwanken stark von Probe zu Probe. Trotzdem zeigen sie immer dieselbe Tendenz: Eine relative Abnahme der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten und einen relativen Anstieg von Lymphozyten.
Vergleicht man die Prozentsätze der Zellen mit Karyolyse bei den drei Lagerungstemperaturen miteinander (s. Abb. 4), so ist der des bei $4^{o}C$ gelagerten Blutes auch der kleinste: 3-11 %.
Da bei $4^{o}C$ gelagertes Blut die geringsten Veränderungen bezüglich Morphologie und relativer Zellverteilung aufwies, außerdem karyolytische Zellen nur selten vorkamen, hielten wir für unsere folgenden Untersuchungen $4^{o}C$ für die günstigste Aufbewahrungstemperatur.

3.2. Normale Blutbilder

Von weiteren 15 Probanden (Männer und Frauen unterschiedlichen Alters) wurden Ausstriche sofort nach Entnahme des venösen Blutes, nach 3, 6 und 24 Std. Lagerung bei $4^{o}C$ und zum Vergleich jeweils ein Kapillarblutausstrich gemacht.
An Hand der verhältnismäßig kleinen ausgezählten Zellzahl konnten wir feststellen, daß im Differentialblutbild des Kapillarblutes der relative Lymphozytenanteil höher lag als in dem des venösen Blutes (s. Abb. 1, 2 und 3).

3.2.1. Zellverteilung

Während der Lagerung nahm die relative Zahl der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten ab, dafür stieg die der Lymphozyten und neutrophilen stabkernigen Granulozyten

Tabelle 1

Prozentuale Änderung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Differentialblutbild Gesunder nach 24 Std. Lagerung der Blutröhrchen im Vergleich zum Ausgangswert

a) Lagerung bei Zimmertemperatur

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1	85	11	62	29	-27,1	+ 163,6
2	52	42	64	29	+23,o	- 31,o
3	81	9	62	22	-23,5	+ 144,4
4	63	21	4o	51	-36,4	+ 142,7
5	7o	21	39	54	-44,3	+ 157,1
6	6o	29	5o	44	-16,7	+ 51,7
7	6o	19	5o	32	-16,7	+ 68,4
8	74	24	49	39	-33,8	+ 62,5
9	64	29	34	55	-46,9	+ 89,6
1o	82	14	23	73	-72,o	+ 421,4

b) Lagerung bei 37°C

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1	85	11	63	35	-25,9	+ 218,1
2	52	42	65	31	+25,o	- 26,2
3	81	9	6o	29	-26,o	+ 222,2
4	63	21	38	53	-39,7	+ 152,3
5	7o	21	53	44	-24,3	+ 1o9,5
6	6o	29	49	45	-18,4	+ 55,1
7	6o	19	39	4o	-35,o	+ 11o,5
8	74	24	62	29	-16,3	+ 2o,8
9	64	29	49	39	-23,5	+ 34,4
1o	82	14	55	38	-33,o	+ 171,4

c) Lagerung bei 4°C

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1	85	11	79	11	- 8,o	± o,o
2	52	42	54	42	+ 3,8	± o,o
3	81	9	65	15	- 19,8	+ 66,6
4	63	21	52	36	- 17,5	+ 71,4
5	7o	21	6o	32	- 14,3	+ 52,3
6	6o	29	6o	31	± o,o	+ 6,8
7	6o	19	52	25	- 13,4	+ 31,5
8	74	24	6o	36	- 17,6	+ 5o,o
9	64	29	48	48	- 25,o	+ 65,5
1o	82	14	62	33	- 24,4	+ 135,7
11	75	18	71	25	- 5,4	+ 38,8
12	78	15	71	24	- 9,o	+ 6o,o
13	59	25	58	25	- 1,7	± o,o
14	68	24	51	39	- 25,o	+ 38,9
15	74	21	58	33	- 21,7	+ 57,1
16	64	25	51	4o	- 2o,4	+ 55,5
17	64	31	-	-	-	-
18	65	27	53	44	- 18,5	+ 62,9
19	65	27	54	36	- 17,o	+ 33,3
2o	56	33	46	45	- 17,9	+ 36,3
21	76	16	7o	25	- 7,9	+ 56,2
22	51	37	52	39	+ 1,9	+ 5,4
23	5o	36	47	4o	- 6,o	+ 11,1
24	74	19	63	26	- 14,9	+ 36,8
25	58	38	44	51	- 24,2	+ 34,2

im allgemeinen an. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Vorversuche.
In einigen Fällen blieb die relative Lymphozytenzahl konstant bzw. verringerte sich sogar. Die prozentuale Änderung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten nach 24 Std. in bezug auf den Zeitpunkt 0, also Ausstrich sofort nach Entnahme, ist in der Tabelle 1c dargestellt.

3.2.2. Zellmorphologie

3.2.2.1. Basophile segmentkernige Granulozyten

Hier konnte kein Ergebnis erzielt werden, da die Zellen kaum vorhanden waren und wenn, dann konnten sie bereits nach 3 Std. - auch bei genauerem Suchen - nicht mehr aufgefunden werden.

3.2.2.2. Eosinophile segmentkernige Granulozyten

Die relative Zellzahl nahm innerhalb der 24 Std. Lagerung ab. Nach 3 Std. war das Zytoplasma nicht mehr vollständig von eosinophiler Granula ausgefüllt und hatte einzelne Vakuolen. Bei den 6-Std.-Werten konnten Zellen ausgemacht werden, die eosinophilen stabkernigen Granulozyten ähnelten, d.h., sie hatten die typische Zwickerform ihrer Kerne verloren. Nach 24 Std. verringerte sich die eosinophile Granula weiterhin und war färberisch schwächer dargestellt. Die Kerne hatten teils eine klumpige Gestalt, teils waren sie im Gegensatz dazu vakuolenartig aufgehellt, und die Chromatinstruktur schien aufgelockert. Manchmal war diese aufgelockerte Chromatinstruktur von lokalen Verdichtungen bzw. Verklumpungen durchsetzt. Auch gab es Zellen, deren Kern in zwei Teile zerfallen war. Allgemein erschien das Bild der eosinophilen segmentkernigen Granulozyten nicht mehr einheitlich.

3.2.2.3. Neutrophile segmentkernige Granulozyten

Erst nach 6 Std. konnten deutliche Änderungen beobachtet werden. Neben morphologisch unveränderten Zellen gab es solche, bei denen sich die Kernsegmente dichter zusammengelagert hatten, so daß sie neutrophilen stabkernigen Granulozyten ähnelten (s. Abb. 7a und b).
Andere Zellen besaßen noch stärkere Degenerationsmerkmale. Sie hatten bereits einen pyknotischen Kern (s. Abb. 8a und b). Die Kernstruktur war völlig aufgehoben und stellte sich homogen dar. Nach 24 Std. waren die morphologischen Veränderungen wesentlich ausgeprägter. Im Zytoplasma fand man neben Vakuolen hin und wieder azurophile Granula. Manche Kerne hatten nur zwei Segmente mit einem schmalen Verbindungsstück und ähnelten so Pelger-Huet-Zellen. Andere Kerne dagegen waren hypersegmentiert wie bei einer Rechtsverschiebung der Granulopoese. Zusätzlich hatten die Kerne zystische Aufhellungen. Häufig fand man Zellen mit völlig verklumptem homogenisiertem Kern und einem schmalen Zytoplasmasaum, die alten Lymphozyten ähnelten (s. Abb. 8c-f).

3.2.2.4. Lymphozyten

Die Lymphozyten blieben im Vergleich zu allen anderen Zelltypen relativ lange morphologisch unverändert. Doch auch sie zeigten nach 6 Std. Lagerung Zeichen der Degeneration. Ihr Zytoplasmasaum wurde schmäler und erschien hin und wieder wie ausgezackt. Dazu lag das Chromatin im Kern dichter beieinander, so daß die helleren Bezirke allmählich verschwanden.
Auffälliger waren die Veränderungen nach 24 Std. Die Kerne waren pyknotisch und das Zytoplasma fast völlig verschwunden, so daß auch die gelegentlich vorkommende Azurgranulation, die manche Lymphozyten besitzen, nicht mehr zu erkennen war. Manche Kerne wiesen Einschnürungen auf und bekamen so ein gelapptes Aussehen. Ganz vereinzelt konnten

wir virozytenähnliche Formen finden, sie hatten einen langgestreckten Kern mit einem weiten Plasmasaum von unterschiedlich starker Basophilie.

3.2.2.5. Monozyten

Die Lagerungsdauer verursachte bei den Monozyten hauptsächlich Veränderungen im Kern. Nach 6 Std. war er oft nicht so charakteristisch gelappt und besaß vakuolenartige Aufhellungen. Daneben lagen aber auch morphologisch unveränderte Monozyten vor. Nach 24 Std. vermehrten sich die kleinen Aufhellungszonen im Kern, teilweise war er bizarr gelappt und seine Chromatinstruktur aufgelockert.

3.2.2.6. Zerstörte Zellen

In dem 24 Std. gelagerten Blut fanden wir neben Nekrozyten (s. Abb. 8e und f) auch völlig strukturlose homogen gefärbte Gebilde, die jegliche Zuordnung zu einer bestimmten Zellkategorie unmöglich machten.

3.3. Blutbilder bei Virusinfekten

Wir untersuchten das Blut von 6 Patienten mit einem frischen Virusinfekt, darunter ein Fall einer ausgeprägten Monozytose.
An Hand der kleinen Patientenzahl konnten wir feststellen, daß die Zahl der Lymphoidzellen nur unwesentlich höher im venösen als im kapillaren Differentialblutbild lag. Dafür war im Kapillarblut die relative Lymphozytenzahl leicht erhöht im Vergleich zum venösen.

3.3.1. Zellverteilung

Das Ergebnis war wie bei den normalen Blutbildern:
Die relative Zahl der Lymphozyten und neutrophilen stabkernigen Granulozyten stieg im Laufe der Lagerung an,

während die aller anderen Blutzellen einschließlich der Lymphoidzellen abnahm (s. auch Tab. 2a).

3.3.2. Zellmorphologie

Nach 6 Std. waren die typischen Lymphoidzellen kaum noch zu erkennen. Hingegen fanden wir nun große Lymphozyten, deren Kerne vereinzelt hellere Zonen aufwiesen. Nach 24 Std. verwischte sich das typische Blutbild vollständig. Vermehrt kamen große Lymphozyten mit zystischen Aufhellungen vor oder alte Lymphozyten mit Kerneinschnürungen. Selten konnte noch eine typische Lymphoidzelle diagnostiziert werden. Meist war es nicht mehr eindeutig zu klären, ob wir es mit einem Lymphozyten oder einer Lymphoidzelle zu tun hatten (s. Abb. 9a-d).
Die morphologischen Veränderungen der anderen Blutzellen entsprachen denen, die nach 3, 6 und 24 Std. auch in den normalen Blutbildern gefunden wurden.
Im Differentialblutbild der Monozytose war charakteristisch, daß die Monozytenzahl im Kapillarblut gegenüber dem Venenblut erhöht war. Nach 24 Std. sank die relative Monozytenzahl um mehr als 5o %.
Auch hier stieg die relative Zahl der Lymphozyten und neutrophilen stabkernigen Granulozyten und sank die aller anderen Zellen. Die morphologischen Veränderungen der Blutzellen unterschieden sich in keiner Weise von denen, die in den Blutbildern der anderen Virusinfekte festgestellt wurden.

3.4. Blutbilder myeloproliferativer Erkrankungen

1. chronisch myeloische Leukämie = CML
2. chronisch lymphatische Leukämie = CLL
3. sonstige maligne Lymphome
4. Plasmozytom
5. Polycythaemia vera
6. Osteomyelofibrose u.a.

3.4.1. Chronisch myeloische Leukämie

Das Blut von 5 Patienten wurde wie schon beschrieben behandelt und untersucht (vgl. Abschnitte 2.2. - 2.4.). Dabei konnten wir zwischen kapillarem und venösem Differentialblutbild keinen Unterschied feststellen.

3.4.1.1. Zellverteilung

Die Differentialblutbilder der 5 Patienten waren zur Zeit t = o nicht einheitlich. Als Zeichen der gestörten Granulopoese überwogen bei den jugendlichen Formen einmal die Promyelozyten, dann wiederum die Myelozyten oder die neutrophilen stabkernigen Granulozyten. Allgemein sank im Laufe der Lagerung die relative Zahl der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten und stieg die der Lymphozyten. Myeloblasten und Promyelozyten waren nicht mehr zu finden. Die relative Zahl der Myelozyten blieb in 2 Fällen gleich, in 2 Fällen fiel sie ab und in einem Fall stieg sie um mehr als 5o %. Die relative Zahl der jugendlichen Granulozyten nahm allgemein zu. Bereits nach 6 Std. stieg die relative Zahl der neutrophilen stabkernigen Granulozyten sprunghaft an, dies verstärkte sich noch bis zum 24-Std.-Wert. Teilweise verfünffachten sich die Werte (s. auch Tab. 2b).

3.4.1.2. Zellmorphologie

Die jüngsten noch nach 24 Std. nachweisbaren Zellen waren die Myelozyten, die wenn sie noch zu finden waren, vakuolenartige Aufhellungen im Kern hatten. Auch ihr Zytoplasma besaß Vakuolen. Die Kerne der jugendlichen Granulozyten waren teils von helleren teils von dichteren dunkleren Zonen durchsetzt, so daß die Chromatinstruktur allgemein grobscholliger erschien. Der Zytoplasmasaum war obendrein schmaler geworden. Bei den neutrophilen stabkernigen Granulozyten fielen hin und wieder zystische Aufhellungen im Kern auf. Alle anderen Zelltypen

wiesen wieder die gleichen morphologischen Veränderungen auf wie im normalen Blutbild.
Der Prozentsatz zerstörter Zellen war nicht höher als im normalen Blutbild: 5-1o %.

3.4.2. Chronisch lymphatische Leukämie

Dazu wurden Ausstriche von 12 Patienten untersucht. In den Differentialblutbildern aus venösem Blut konnten wir eine höhere Lymphozytenzahl - bis zu 1o % - und eine niedrigere Zahl neutrophiler segmentkerniger Granulozyten als in denen des Kapillarblutes feststellen.

3.4.2.1. Zellverteilung

Auch hier bekamen wir ein ähnliches Ergebnis wie schon bei den vorherigen Untersuchungen (s. auch Tab. 2c). Zusätzlich tauchten in den 3-Std.-Werten erstmals neutrophile stabkernige Granulozyten auf, die im sofort angefertigten Ausstrich fehlten. Nach 24 Std. waren sie sogar um 2-1o % vermehrt.

3.4.2.2. Zellmorphologie

Die dominierenden Zellen waren Lymphozyten, während neutrophile segmentkernige Granulozyten an zweiter Stelle kamen. Daneben gab es vereinzelt Monozyten und neutrophile stabkernige Granulozyten. Ihre Veränderungen entsprachen denen im normalen Blutbild.
Das mehr oder weniger starke Vorkommen von Gumprechtschen Kernschatten im Blutbild ist ein Charakteristikum für diese Krankheit. Die Lagerzeit verstärkte den Befund, so daß es schwierig war, nach 24 Std. noch 1oo erhaltene kernhaltige Zellen zu differenzieren.

3.4.3. Maligne Lymphome

Die 4 untersuchten Blutbilder stammten von Patienten mit

einem Brill-Symmers, einer akuten lymphatischen Leukämie, einem Lymphosarkom und einem Morbus Hodgkin. Behandlung der Blutproben und -ausstriche wie oben. Bei der akuten lymphatischen Leukämie unterschied sich das venöse und kapillare Differentialblutbild beträchtlich. Im kapillaren Differentialblutbild lag die Zahl der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten bei 62 %, im venösen nur bei 48 %. Es war also fast ein Unterschied um 3o %. Dementsprechend lag im venösen Differentialblutbild die Zahl der Lymphoblasten höher. Bei den anderen Fällen ergab sich kein Unterschied zwischen venösem und kapillarem Blutbild.

3.4.3.1. Zellverteilung

Wie schon bei den normalen Blutbildern nahm auch hier die relative Zahl der Lymphozyten und neutrophilen stabkernigen Granulozyten zu, wobei die aller anderen sank (s. auch Tab. 2d).

3.4.3.2. Zellmorphologie

Die morphologischen Veränderungen waren dieselben wie im normalen Blutbild. Der Prozentsatz zerstörter Zellen entsprach dem Ergebnis im normalen Blutbild. Außergewöhnlich hoch war er nur im Brill-Symmers-Blutbild: 23 %.

3.4.4. Plasmozytom

Wir untersuchten Blutbilder von 12 Patienten. Die kapillaren und venösen Blutausstriche unterschieden sich nicht.

3.4.4.1. Zellverteilung

Die relative Lymphozytenzahl stieg im Laufe der Zeit an, ebenso minimal die der neutrophilen stabkernigen Granulozyten, alle anderen Zellen sanken zahlenmäßig im Differentialblutbild (s. auch Tab. 2e).

3.4.4.2. Zellmorphologie

Die morphologischen Veränderungen entsprachen denen im normalen Blutbild.
Der Prozentsatz zerstörter Zellen lag bei 2-1o % also ähnlich wie im normalen Differentialblutbild.

3.4.5. Polycythaemia vera

Das Blut von 3 Patienten mit diesem Krankheitsbild wurde von uns untersucht. Die Behandlung der Blutproben und -ausstriche siehe oben. Zwischen kapillarem und venösem Differentialblutbild konnten wir keinen wesentlichen Unterschied feststellen.

3.4.5.1. Zellverteilung

In 2 der 3 Differentialblutbilder stieg die Zahl der Lymphozyten mit der Lagerungszeit an, während alle anderen Zellen zahlenmäßig abnahmen. Im dritten Differentialblutbild war es jedoch genau umgekehrt (s. Tab. 2f).

3.4.5.2. Zellmorphologie

Hier wiederholten sich die Resultate aus den Versuchen mit normalen Blutbildern.

3.4.6. Osteomyelofibrose / Gluthationreduktasemangel

Wir untersuchten Blut von zwei Patienten mit Osteomyelofibrose und einem Patienten mit Gluthationreduktasemangel. Letzteres Krankheitsbild ergab dieselben Befunde wie bisher. Die relative Zahl der Lymphozyten war im kapillaren Blutbild leicht erhöht und die der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten erniedrigt.

3.4.6.1. Zellverteilung

In dem Differentialblutbild der Patienten mit Osteomyelofibrose blieb der Anteil der neutrophilen segmentkernigen

Granulozyten nach 24 Std. Lagerung gleich bzw. fiel minimal. Die neutrophilen stabkernigen Granulozyten nahmen prozentual in einem Fall zu, in dem anderen sanken sie dagegen. Die relative Zahl der Lymphozyten verdoppelte sich im ersten, während sie sich im letzteren Fall kaum änderte (s. Tab. 2g). Die jüngsten Formen der Granulopoese - wie Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten -,die typisch sind für eine pathologische Linksverschiebung, verschwanden während der Lagerungszeit allmählich und waren nach 24 Std. nicht mehr aufzufinden.

3.4.6.2. Zellmorphologie

Die Veränderungen bezüglich der Zellgestalt waren dieselben wie im normalen Blutbild bzw. bei der chronisch myeloischen Leukämie. Der Prozentsatz zerstörter Zellen lag mit 14-15 % ein wenig über dem im normalen Blutbild mit 3-11 %.

3.4.7. Blutbilder unter Zytostatika-Therapie

Wir untersuchten das Blut von 11 Patienten, die mit Zytostatika behandelt worden waren. 3 Patienten mit einem Plasmozytom hatten 2 Wochen vor Blutentnahme eine Melphalan-Corticoid-Stoß-Therapie erhalten. Wir wählten diesen Zeitpunkt der Blutentnahme, da etwa 14 Tage nach Stoßbeginn die periphere Zytopenie am deutlichsten ausgeprägt ist und wir deshalb glaubten, den Zytostatikaeffekt am besten erfassen zu können. Die anderen 8 Patienten, einer mit einer Polycythaemia vera, 3 mit einem malignen Lymphom und 4 mit einer chronisch myeloischen Leukämie wurden mit Myleran bzw. Leukeran behandelt. Die Zytostatika-Therapie war bei einigen von ihnen unterbrochen worden, wenn dies aus therapeutischen Gründen oder wegen Nebenwirkungen notwendig geworden war. In keinem Fall war das therapiefreie Intervall größer als 2 Wochen.

Die Blutproben und -ausstriche wurden wie in den bisherigen Untersuchungen behandelt und ausgewertet.
Die Ergebnisse bezüglich Zellverteilung und Zellmorphologie unterschieden sich in keiner Weise von denen, die bei den nicht mit Zytostatika behandelten Patienten erzielt worden waren. Der Prozentsatz zerstörter Zellen lag im Bereich von 3-10 % und war also vergleichbar mit dem im normalen Blutbild.

Tabelle 2

Prozentuale Änderung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Differentialblutbild nach 24 Std. Lagerung bei 4°C im Vergleich zum Ausgangswert.

2a) Differentialblutbilder bei Virusinfekten

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1	3o	36	1o	53	- 66,7	+ 41,2
2	53	2o	66	22	+ 24,5	+ 1o,o
3	2o	46	19	42	- 5,o	- 8,7
4	38	31	15	46	- 6o,6	+ 48,3
5	24	48	8	56	- 66,7	+ 16,6
6	63	16	6o	23	- 4,8	+ 43,7

2b) Differentialblutbilder bei chronisch myeloischer Leukämie

Zy = Patient hatte eine Zytostatikatherapie erhalten.

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1 (Zy)	25	12	6	29	- 76,o	+ 141,6
2 (Zy)	11	o	14	1o	+ 21,2	+1ooo,o
3 (Zy)	33	3	38	7	+ 15,1	+ 133,3
4 (Zy)	67	8	32	12	- 52,3	+ 5o,o
5	3o	2	15	3	- 5o,o	+ 5o,o

2c) Differentialblutbilder bei chronisch lymphatischer Leukämie

Zy = Patient hatte eine Zytostatikatherapie erhalten

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1 (Zy)	5	95	1	98	- 8o,o	+ 3,1
2	11	83	1o	87	- 9,1	+ 4,8
3	2	97	5	93	+ 15o,o	- 4,2
4	36	6o	25	61	- 3o,6	+ 1,6
5	3	94	11	86	+ 266,6	- 8,6
6	19	76	7	93	- 63,2	+ 22,3

2d) Differentialblutbilder bei sonstigen malignen Lymphomen

Zy = Patient hatte eine Zytostatikatherapie erhalten

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1 (Zy)	12	87	7	93	- 41,7	+ 6,8
2	74	15	66	27	- 1o,9	+ 8o,o
3	45	52	37	59	- 17,8	+ 13,4
4	48	48	54	43	+ 12,5	- 1o,5

2e) Differentialblutbilder bei Plasmozytom
Zy = Patient hatte eine Zytostatikatherapie erhalten

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1	27	61	3o	61	+ 11,1	± o,o
2 (Zy)	77	2o	67	3o	- 19,o	+ 5o,o
3 (Zy)	5o	47	33	64	- 34,o	+ 36,1
4 (Zy)	63	26	59	38	- 6,4	+ 46,1
5	57	33	53	45	- 7,1	+ 36,3
6	91	9	89	8	- 8,2	- 11,2
7	54	34	47	43	- 19,o	+ 26,4
8	73	22	7o	29	- 4,2	+ 31,8
9	79	2o	79	19	± o,o	- 5,o
1o	78	21	71	19	- 9,o	- 9,6
11	59	34	65	24	+ 1o,1	- 29,5
12	61	33	41	46	- 32,8	+ 39,3

2f) Differentialblutbilder bei Polycythaemia vera
Zy = Patient hatte eine Zytostatikatherapie erhalten

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1	89	5	76	21	- 14,7	+ 32o,o
2 (Zy)	86	6	83	8	- 3,5	+ 33,3
3	46	43	53	4o	+ 15,2	- 7,o

2g) Differentialblutbilder bei Osteomyelofibrose (1 und 2) und Gluthationreduktasemangel (3)

Patient	t_o		t_{24}		Änd. in %	
	Seg %	Lymph %	Seg %	Lymph %	Seg	Lymph
1	76	8	77	9	+ 1,3	+ 12,5
2	61	13	57	26	- 6,7	+ 1oo,o
3	74	21	68	27	- 8,2	+ 28,5

3.4.8. Leukozytenzählung im Coulter Counter

Auf Grund des Befundes, daß im Differentialblutbild die Zahl der Lymphozyten im Laufe der Lagerung stieg und die der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten und aller anderen Zellen sank, stellte sich die Frage, wie sich die absolute Leukozytenzahl verhält.
Dazu entnahmen wir venöses Blut bei 25 Probanden und fingen es wieder in je vier mit K-EDTA beschichtete Kunststoffröhrchen auf.
Das erste Röhrchen wurde sofort im Coulter Counter ausgewertet, die drei anderen bis zur Zählung nach 3, 6 und 24 Std. im Kühlschrank bei $4^{o}C$ aufbewahrt. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Allgemein nahm die Zellzahl ab, $\bar{x}_{t_o} = 7{,}09 \times 10^3$ Leukozyten im Vergleich zu $\bar{x}_{t_{24}} = 6{,}6 \times 10^3$ Leukozyten. Erstaunlich war, daß die mittlere Zellzahl nach 6 Std. höher lag ($\bar{x}_{t_6} = 6{,}85 \times 10^3$) als nach 3 Std. ($\bar{x}_{t_3} = 6{,}7 \times 10^3$), dafür aber nach 24 Std. deutlich sank ($\bar{x}_{t_{24}} = 6{,}6 \times 10^3$). Bei einigen Blutproben erhielten wir nach 24 Std. Lagerung höhere Werte als die entsprechenden Ausgangswerte (Vergleich Patient Nr. 6, 16, 19 in Tabelle 3).

Tabelle 3

Apparative Leukozytenzählung im Coulter Counter sofort nach Entnahme des venösen Blutes und nach 3, 6 und 24 Std. Lagerung der K-EDTA-Blutröhrchen bei $4^{o}C$ (Leukozytenzahl x $1o^{3}$)

Patient	t_o	t_3	t_6	t_{24}
1	8,5	8,3	7,7	8,4
2	9,o	8,4	8,8	6,2
3	6,7	5,6	6,1	5,4
4	7,3	7,2	7,7	6,8
5	6,9	6,4	6,8	4,5
6	7,6	7,o	7,4	11,2
7	6,1	5,9	6,9	5,7
8	5,o	5,3	5,2	4,4
9	11,9	1o,8	11,3	9,3
1o	6,9	6,5	7,5	6,8
11	9,o	8,2	9,o	6,7
12	4,6	4,7	5,2	o,o
13	4,5	3,7	3,9	3,8
14	5,7	5,5	5,1	5,1
15	6,6	6,6	6,1	6,3
16	7,6	7,2	8,1	13,3
17	7,1	6,8	6,4	5,3
18	8,3	7,6	7,8	7,7
19	9,3	9,3	9,3	14,4
2o	5,3	4,8	4,8	4,9
21	7,2	7,1	6,5	6,7
22	6,9	6,9	6,5	6,5
23	5,1	4,3	4,2	4,o
24	6,9	6,7	6,1	6,4
25	7,3	6,7	7,o	5,3
$\bar{x}$	7,o9	6,7o	6,85	6,6o

3.5. Zytochemie

3.5.1. PAS-Färbung

Für diese Untersuchungsreihe wurde venöses und kapillares Blut von 15 hämatologisch gesunden Frauen und Männern unterschiedlichen Alters entnommen. Die Blutproben wurden wieder bei 4° C Kühlschranktemperatur gelagert, und die Ausstriche wurden sofort nach 3, 6 und 24 Std. angefertigt.

3.5.1.1. Kapillares und venöses Blutbild

Der Index (vergl. Abschnitt 2.5) bei den kapillaren Blutausstrichen lag bei einem mittleren Wert von 292 (Standardabweichung = $\pm$ 8,08), während sich die venösen Blutbilder schwächer PAS-positiv färbten und einen mittleren Wert von 270 (Standardabweichung = $\pm$ 33,6) erreichten.

3.5.1.2. Grad der PAS-Positivität

Nach 3 Std. reduzierte sich der mittlere Index auf 212 (Standardabweichung = $\pm$ 29,25), nach 6 Std. auf 143 (Standardabweichung = $\pm$ 19,62) und nach 24 Std. Lagerung sogar auf 87 (Standardabweichung = $\pm$ 46,81). Hier lag also eine deutliche Abnahme der PAS-Positivität vor (s. Abb. 5).

3.5.1.3. Art der Anfärbung

In den frischen Blutausstrichen hatten wir es mit einer starken und diffus über die ganze Zelle verteilten granulären Anfärbung zu tun (s. Abb. 10a). Dieses Erscheinungsbild schwächte sich im Laufe der Zeit ab, so daß wir nach 24 Std. nur noch einzelne schwach PAS-positive Bezirke innerhalb des Zytoplasmas finden konnten (s. Abb. 10b).

3.5.2. Sudanschwarz-B-Färbung

Wiederum von 15 Patienten mit normalen Blutbildern wurde kapillares und venöses Blut entnommen und unter denselben Bedingungen wie bei der PAS-Färbung untersucht.

3.5.2.1. Kapillares und venöses Blutbild

Wir konnten keinen Unterschied zwischen den beiden Blutbildern feststellen.

3.5.2.2. Grad der Anfärbung

Der mittlere Index (vgl. Abschnitt 2.5.) der 15 frischen Blutausstriche betrug 252 (Standardabweichung = $\pm$ 15,93), nach 24 Std. Lagerung hatte er den Wert 25o (Standardabweichung = $\pm$ 15,21). Hier lag also kein Unterschied vor (s. Abb. 6).

3.5.2.3. Art der Anfärbung

Auch die Art der Anfärbung änderte sich nicht während der Lagerungszeit. Sowohl in den frischen Kapillarblutausstrichen als auch in den venösen Blutausstrichen nach 24 Std. waren die Zellen entweder stark sudanophil oder hatten stark positive abgrenzbare Kompartimente (s. Abb. 11a-c).

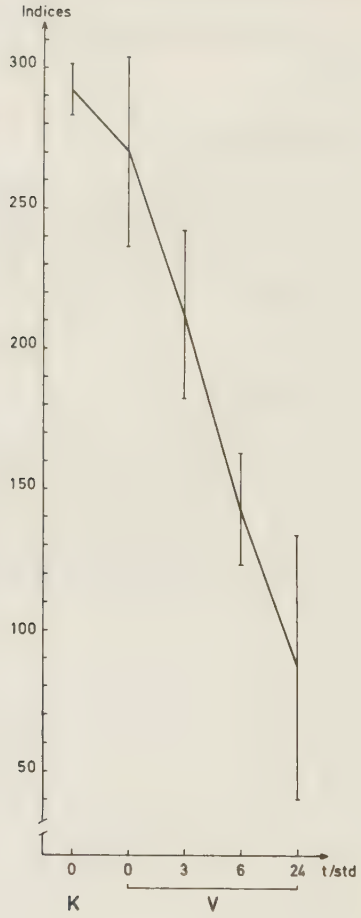

Abb. 5: Indices der PAS-Färbung (Mittelwerte mit Standardabweichungen) von venösem K-EDTA-Blut (V) - Lagerzeit o, 3, 6 und 24 Std. - im Vergleich zum Kapillarblut (K).

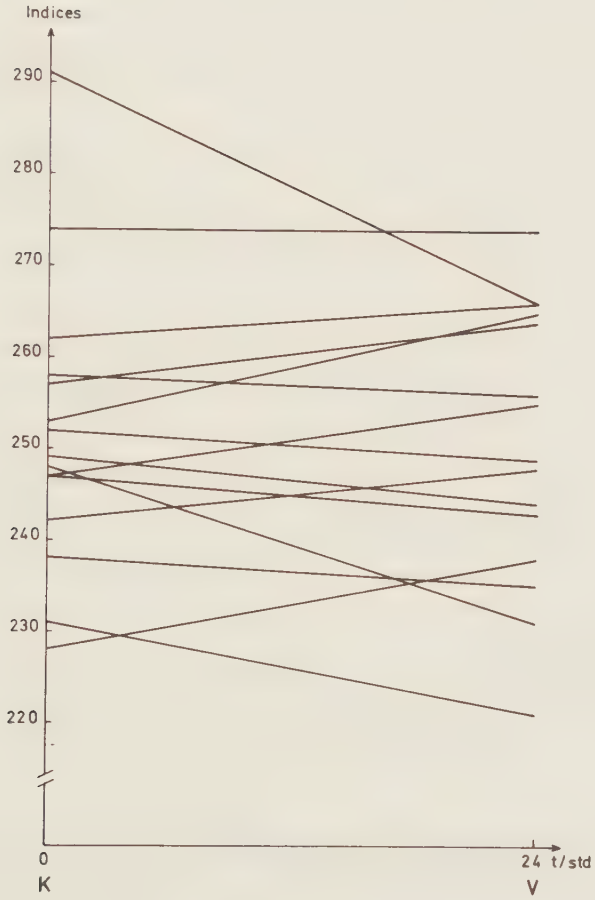

Abb. 6: Indices der Sudanschwarz-B-Färbung von Kapillarblut (K) im Vergleich zu dem von venösem Blut (V) nach 24 Std. Lagerung.

4. Diskussion

4.1. Problematik

Die vorliegenden Untersuchungen gingen von folgenden Fragestellungen aus:

a) Können aus K-EDTA-Blut Differentialblutbilder von Gesunden, Patienten mit Virusinfekten und Patienten mit haematologischen Systemerkrankungen auch nach längerer Lagerung zur eindeutigen und richtigen Diagnosestellung verwendet werden ?

b) Welche Änderungen treten im Differentialblutbild auf, und sind diese gegebenenfalls so ausgeprägt, daß eine Auswertung nicht mehr zu verantworten ist ?

c) Ändert sich auch der zytochemische Befund bei PAS- und Sudanschwarz-B-Färbung, wenn das K-EDTA-Blut länger gelagert wurde und wenn ja, inwieweit ?

4.2. Kapillar- und Venenblutausstrich

Im Vergleich zu den venösen Blutbildern wurde von jedem Probanden ein Kapillarblutausstrich angefertigt, der also ohne Antikoagulanszusatz war. Vergleiche mit den frischen Venenblutausstrichen ergaben nur bezüglich der Zellverteilung Unterschiede. Die relative Zahl der Lymphozyten im normalen und pathologischen Kapillarblutbild war fast immer höher, dafür die der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten niedriger. Bei Virusinfekten konnten wir im kapillaren Differentialblutbild dazu vermehrt Lymphoidzellen auszählen. Alle anderen Zellformen waren gleichmäßig im Kapillar- und Venenblutbild verteilt. KUSE und HAUSMANN (17) berichten, daß die absolute Leukozytenzahl im Kapillarblut höher liegt als im Venenblut und deswegen bei der Zellzählung eine Leukozytose diagnostiziert werden könnte, weil die Leukozytenzahlen

um 1000-4000/mm^3 zu hoch liegen. Sie sehen als Grund für die Leukozytenanreicherung in den Kapillaren eine lokale Stase, die durch vegetative Reaktionen auf den Einstich und Temperatureinflüsse hervorgerufen wird. Deswegen plädieren sie für eine Zellzählung aus Venenblut, das ihrer Meinung nach repräsentativere Befunde für den Organismus liefert. Im Differentialblutbild fanden SCHMIDT und Mitarbeiter (26) die höchsten Lymphozytenwerte im Venenblut, die niedrigsten im Fingerbeerenblut, was im Gegensatz zu unseren Ergebnissen steht. Für neutrophile und eosinophile segmentkernige Granulozyten und Monozyten fanden sie nur geringfügige Unterschiede, die statistisch nicht signifikant waren.
Unseren Ergebnissen entsprechend muß man eine leichte Differenz zwischen kapillarem und venösem Differentialblutbild bezüglich der Verteilung von Lymphozyten und neutrophilen segmentkernigen Granulozyten einkalkulieren: Im Kapillarblut ist die Lymphozytenzahl meist höher, die der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten niedriger als im venösen Blutbild. Die im peripheren Blutbild vorkommenden pathologischen Zellen wie die unreifen Granulozytenformen bei der chronisch myeloischen Leukämie und der Osteomyelofibrose waren im kapillaren und venösen Blutbild gleichmäßig verteilt.

4.3. Lagerungstemperatur

Um einen ungünstigen Einfluß der Lagerungstemperatur auf das Differentialblutbild weitgehendst auszuschalten, wurde in den Vorversuchen die Temperatur ermittelt, bei der die Morphologie der Blutzellen am wenigsten verändert und der Anteil zerstörter Zellen am geringsten war. Die von uns gewählten Temperaturbedingungen: 4°C, Zimmertemperatur und 37°C basierten auf den Überlegungen, daß bei 4°C eine mögliche "Konservierung" (s. unten) entsteht. Bei 37°C haben wir im Wärmebad versucht, die Blut-

zellen unter physiologischer Temperaturbedingung zu belassen. Die Zimmertemperatur als Aufbewahrungstemperatur bietet sich insofern an, da sie für die Lagerung am einfachsten zu verwirklichen und auch wohl die im Labor übliche Aufbewahrung der Röhrchen ist. Der Vergleich der drei Temperaturbedingungen ergab, daß bei $4^{o}C$ die Morphologie am besten bewahrt wurde und die wenigsten zerstörten Zellen zu zählen waren. Die morphologischen Veränderungen wie Vakuolen im Zytoplasma und alle Formen der Kerndeformierung nahmen mit steigender Temperatur zu. Auch der Anteil zerstörter Zellen war bei $37^{o}C$ am größten (22-57 %), bei Zimmertemperatur lag er bei 11-3o % und bei $4^{o}C$ war er auf 3-11 % gefallen und lag somit deutlich unter dem der beiden anderen Temperaturen. Dieser Befund ist dadurch erklärbar, daß bei sinkenden Temperaturen der Stoffwechsel vermindert ist. Die Zelle benötigt weniger Substrat und lebt trotz schlechterer Voraussetzung länger. Trotzdem haben wir aber auch bei $4^{o}C$ ein verändertes Blutbild im Vergleich zum Ausgangswert bekommen, da ja auch noch hier ein Stoffwechsel stattfindet.

Im Gegensatz zu unseren Befunden steht das Ergebnis von HAUSWALDT und SCHRÖDER (11), die bei Zimmertemperatur die geringsten Veränderungen erhielten und deshalb ihre weiteren Versuche bei dieser Temperatur durchführten. Wir haben hierfür keine befriedigende Erklärung.

Erwähnt seien hier auch die Versuche von Mc CULLOUGH et al. (19), die die Funktion von neutrophilen Granulozyten hinsichtlich ihrer bakteriziden Wirkung innerhalb einer bestimmten Lagerungszeit und -temperatur untersuchten. Sie stellten fest, daß die neutrophilen Granulozyten im EDTA-Blut nach 24 Std. Lagerung bei $4^{o}C$ ihre bakterizide Funktion nur gering eingebüßt hatten. Auch nach diesen Ergebnissen scheint eine Lagerung der Granulozyten bei $4^{o}C$ am günstigsten zu sein.

4.4. Zellverteilung

Im Laufe der Lagerung veränderte sich die Zellverteilung innerhalb des Differentialblutbildes erheblich. Verglichen mit den Ausgangswerten der sofort angefertigten venösen Ausstriche nahmen die Lymphozyten prozentual zu und die neutrophilen segmentkernigen Granulozyten ab. Diese Zu- bzw. Abnahme war nach 6 Std. erstmals eindeutig feststellbar und steigerte sich bis zu den 24-Std.-Werten. Ungefähr in dem Verhältnis wie die relative Zahl der Lymphozyten anstieg, sank die der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten, wenn man von dem prozentual geringen Anteil der Monozyten, eosinophilen und basophilen segmentkernigen Granulozyten absieht.
Auffallend war auch die allmähliche prozentuale Zunahme der neutrophilen stabkernigen Granulozyten, die selten nach 3 Std., oft nach 6 Std., deutlich aber nach 24 Std. festzustellen war. Hier erhebt sich jedoch die Frage, ob wir tatsächlich echte neutrophile stabkernige Granulozyten vorfinden oder ob es sich um sogenannte pseudostabkernige Granulozyten handelt. Denn ohne Linksverschiebung im Ausgangswert ist ein relativer Anstieg von neutrophilen stabkernigen Granulozyten innerhalb der Lagerungszeit unwahrscheinlich. HAUSWALDT und SCHRÖDER (11), die in ihrer Arbeit dasselbe Phänomen beschrieben, sprechen von einer scheinbaren Linksverschiebung bei normalem Ausgangswert. Dieses Problem werden wir bei den morphologischen Veränderungen noch ausführlicher behandeln (vgl. Abschnitt 4.5.).
Eosinophile und basophile segmentkernige Granulozyten nahmen im Differentialblutbild stark ab, wobei die basophilen segmentkernigen Granulozyten nach 24 Std. Lagerung ganz verschwanden.
Die Lymphoidzellen, u.a. Kennzeichen eines Virusinfektes, waren bis 3 Std. Lagerung noch gut zu diagnostizieren und entsprachen anteilmäßig dem Ausgangswert. Nach 6 Std.

dagegen waren sie prozentual schon stark vermindert und nach 24 Std. kaum noch zu finden.
Im Differentialblutbild der chronisch myeloischen Leukämie nahmen die Myeloblasten und Promyelozyten stark ab, so daß sie bereits im Ausstrich nach 6 Std. kaum noch festzustellen waren und schließlich im 24-Std.-Wert ganz fehlten. Die relative Zahl der Myelozyten verhielt sich recht unterschiedlich. In einem Fall war sie von 26 % auf 44 % gestiegen, einmal blieb sie gleich und in anderen Fällen fiel sie ab. Die neutrophilen jugendlichen und stabkernigen Granulozyten nahmen dagegen immer zu. Diese Resultate decken sich mit denen von HAUSWALDT und SCHRÖDER (11, 12).
Zu überlegen ist, ob trotz der für die Granulopoese ungünstigen Voraussetzung (4°C!) die unreifen Zellen innerhalb der Lagerungszeit weiter ausreifen und deshalb im Differentialblutbild den Anteil von neutrophilen jugendlichen und stabkernigen Granulozyten erhöhen. Möglich ist aber auch, daß die jüngsten Vorstufen der Granulozyten nicht sehr lagerungsstabil sind, zugrunde gehen und damit das Differentialblutbild zugunsten der scheinbar widerstandsfähigeren neutrophilen jugendlichen und stabkernigen Granulozyten verändern, wobei bei den neutrophilen stabkernigen Granulozyten auch noch ein anderer Gesichtspunkt dazukommt (vgl. Abschnitt 4.5.).
Entgegen allen übrigen Ergebnissen in normalen und pathologischen Blutbildern konnten wir in beiden Fällen von Osteomyelofibrose nach 24 Std. feststellen, daß sich der prozentuale Anteil der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten kaum geändert hatte. In einem Fall war der Lymphozytenanteil sogar nach 24 Std. niedriger als im Ausgangswert. Eine Erklärung hierfür haben wir nicht. - Wenn man von einigen pathologischen Blutbildern absieht, haben wir während der Lagerung immer einen Anstieg von Lymphozyten und einen Abfall aller anderen weißen Blutzellen (Ausnahme: Neutrophile stabkernige Granulozyten,

bei denen aber nicht ganz feststeht, ob es sich um echte oder pseudostabkernige handelt, vgl. Abschnitt 4.5.) im Differentialblutbild bekommen. Dieses Phänomen könnte auch auf Grund der verschiedenen Adhäsionsfähigkeit der Leukozyten zustande kommen. Versuche darüber haben nämlich ergeben, daß die Lymphozyten keine Adhärenz besitzen (2). Wenn wir also nach 24 Std. einen Ausstrich anfertigen, besteht die Möglichkeit, daß hauptsächlich Lymphozyten im Blut gelöst sind, während alle anderen Blutzellen an der Röhrchenwand kleben. Im pathologischen Blut verändert sich diese Adhäsionsfähigkeit, so daß z. B. bei Leukämie neutrophile und eosinophile segmentkernige Granulozyten, Metamyelozyten, einige Myelozyten und Monozyten keine Adhärenz mehr besitzen (2). Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum wir bei der chronisch myeloischen Leukämie einen Anstieg der neutrophilen jugendlichen Granulozyten nach 24 Std. erhielten.
Anhand unseres Untersuchungsgutes konnten wir in jedem Fall, ob normales oder pathologisches Blutbild, immer 1oo Zellen auszählen. Auch bei den Patienten, die vor Blutentnahme mit Zytostatika behandelt worden waren, konnten eindeutig 1oo Zellen differenziert werden. HAUSWALDT und SCHRÖDER (11, 12) konnten jedoch ausgehend von 75 Patienten mit normalem Blutbild nach 24 Std. bei Zimmertemperatur in 32, bei 4°C in 45 und bei 37°C sogar in 63 Ausstrichen nicht mehr 1oo Zellen auswerten. Bei Hämoblastosen und Zytostatika-Therapie war es ihnen nur noch vereinzelt möglich.

4.5. Zellmorphologie

Die Ergebnisse zeigen, daß die durch Lagerung bedingte Veränderung in der Zellverteilung eng mit der der Zellmorphologie verknüpft ist. Zellen verloren ihre typischen Charakteristika bzw. ähnelten anderen Zellformen. Alle Leukozyten wiesen im Laufe der Lagerungszeit mehr oder

weniger starke Zeichen einer geschädigten Zelle auf. Diese morphologischen Veränderungen waren letztlich die Folge der sich in der Zelle abspielenden biologischen Veränderungen an Membranen und Zellorganellen. Die eigentliche Nekrose war dann nur noch das Resultat dieses dynamischen Prozesses biochemischer Ausfälle (6).
Im allgemeinen befielen die Degenerationserscheinungen zuerst das Zytoplasma, bevor sie auch im Kern sichtbar wurden (Beispiel: Eosinophile und neutrophile segmentkernige Granulozyten; Ausnahme: Monozyten, bei denen vorwiegend die Kernmorphologie betroffen war).
So fand man nach 3 Std. im Zytoplasma Vakuolen unterschiedlicher Größe und Anzahl oder eine Reduzierung des Zytoplasmasaums (Beispiel: Lymphozyten). Nach 6 Std. waren die Veränderungen schon intensiver und erstreckten sich auch auf den Kern. Er war entweder stark aufgequollen und vakuolenartig aufgehellt oder pyknotisch mit einer homogenen Chromatinstruktur. Letztere Form der Zellschädigung ging schon in Nekrose über.
Zusätzlich zu diesen allgemeinen Zeichen hatte jede Zellform noch ihre eigene Art, auf die Dauer der Lagerung zu reagieren.
Anhand der eosinophilen segmentkernigen Granulozyten, sofern sie noch vorhanden waren, konnten wir gut das Verhalten ihrer Granula beobachten, da sie sich bei ihnen besonders deutlich darstellen. Im Zytoplasma entstanden degranulierte Bezirke, so daß die Zelle im ganzen nicht mehr so stark eosinophil angefärbt wurde.
Bei den neutrophilen segmentkernigen Granulozyten fielen neben der Vakuolenbildung im Zytoplasma vor allem die verschiedenen Formen der Kerndeformierung auf. Bei einigen waren nach 6 Std. die Brücken zwischen den einzelnen Segmenten aufgequollen und gaben den Zellen bei oberflächlichem Mikroskopieren das Aussehen von neutrophilen stabkernigen Granulozyten.

Nach 24 Std. waren diese "pseudostabkernigen" von den echten stabkernigen Granulozyten in den meisten Fällen nicht mehr zu unterscheiden. Wir diagnostizierten also eine Linksverschiebung, die nur vorgetäuscht wurde. Diese Pseudolinksverschiebung verfälschte das gesamte Differentialblutbild.
Auffallend waren nach 24 Std. die durch Kerndeformierung entstandenen Pelgerartigen Formen oder die Ähnlichkeit einzelner neutrophiler segmentkerniger Granulozyten mit alten Lymphozyten.
Im Gegensatz dazu lag ein kleiner Teil von ihnen hypersegmentiert vor, wie man sie sonst bei perniziöser Anämie und anderen megaloblastischen Anämien findet. Diese Hypersegmentation bzw. Rechtsverschiebung der Granulopoese nach 24 Std. wurde bei normalem Ausgangsblutbild diagnostiziert.
Die Lymphozyten, die in vivo die am längsten lebenden Blutzellen sind, zeigten auch in vitro die längste Überlebensfähigkeit, wie wir bezüglich der Zellverteilung im Differentialblutbild festgestellt hatten. Diese scheinbar längere Überlebensfähigkeit im Verhältnis zu allen anderen Leukozyten kann aber auch davon kommen, daß die Lymphozyten im Gegensatz zu den anderen Zellen nicht adherent sind und so prozentual vermehrt im Ausstrich erscheinen (vgl. Abschnitt 4.4.).
Doch auch die Lymphozyten blieben während der Lagerungszeit nicht unversehrt. Gab es im frischen venösen Blutausstrich neben kleinen auch große Lymphozyten, so waren im 24-Std.-Wert nur noch die kleinen fast nacktkernigen Formen zu finden, entsprechend einer ruhenden Zelle, wie JORKE (15) sie bezeichnet. Auch die anfangs noch vorhandenen azurophilen Granula in manchen Lymphozyten verschwanden allmählich. Auch fanden wir nach 24 Std. vermehrt zerstörte Lymphozyten. Sie ähnelten Gumprechtschen Kernschatten, die typisch für die chronisch lymphatische

Leukämie sind. Wahrscheinlich sind die Zellen nach der Lagerung in K-EDTA-Blut leichter lädierbar und werden deshalb beim Ausstreichen eher zerstört.
Monozyten hatten nach 6 Std. Lagerung zystische Aufhellungen im Kern und eine gezackte bizarre Kerndeformierung bei gleichzeitigem Verlust der Kernlappung und waren eigentlich nur noch auf Grund ihrer Größe als solche zu erkennen. Diese Erscheinungen verstärkten sich im 24-Std.-Wert. Obwohl die meisten Zellen irgendeine Form der Degeneration aufwiesen, konnten wir auch vereinzelt morphologisch unversehrte Zellen finden. HAUSWALDT und SCHRÖDER (11, 12) berichten von ähnlichen Ergebnissen.
Auch die Lymphoidzellen veränderten sich und konnten nicht mehr eindeutig als solche erkannt werden. Wir haben uns bei der Differenzierung an folgende Beschreibung gehalten: Kern polymorph, oft nierenförmig oder gelappt, Kernstruktur aufgelockert und grobmaschig, Zytoplasma hell- oder graublau, relativ homogen oder geschummert, besonders charakteristisch ist das Vorhandensein von Vakuolen (1).
In der Literatur herrscht keine Einigkeit sowohl über die Benennung dieser Zellen, die erstmals im Blutbild einer Mononucleosis infectiosa beschrieben wurden, als auch über ihre Herkunft. Wir möchten nur einige wenige Beispiele anführen, weil wir es für wichtig halten, etwas über Definition und Abstammung zu erwähnen, um unsere Resultate verständlicher zu machen. GROSS und JAHN (9) sprechen von Drüsenfieberzellen oder Virozyten als mononucleäre Zellen, die teilweise die Kennzeichen von Lymphozyten, teilweise von Monozyten, teilweise Merkmale beider Zellformen aufweisen. KORINTH (18) beschreibt die Zelle - er bezeichnet sie als lymphoide Retikulumzelle - folgendermaßen: Kern ist polymorph mit einem lockeren feinstrukturierten, meist ziemlich homogenen Grundgerüst,

er liegt meist exzentrisch; das Plasma ist hell basophil und häufig durchscheinend. Für ihn scheint die Zelle im ganzen relativ zerfließlich und keine sehr erhebliche innere Festigkeit aufzuweisen.
JORKE (15) teilt die Lymphoidzellen - wie er sie nennt - nach ihrem Aussehen nochmals in Untergruppen. Dies haben wir bei unseren Auswertungen nicht berücksichtigt, da es im Rahmen dieser Arbeit zu weit führen würde.
LITWINS, LEIBOWITZ und SIEDE - zitiert nach KORINTH (18) - sind der Ansicht, daß es sich um spezifische pathologische Zellen handelt, die sie deshalb, weil sie bei verschiedenen Viruserkrankungen auftauchen, Virozyten nennen. Dementgegen stehen die Meinungen von JORKE (15) und KORINTH (18). Für JORKE (15) ist die Lymphoidzelle keine pathologische, sondern eine normale Blutzelle, die auf dem Boden einer relativ hyperplastischen Aktivität des retikulohistiozytären Systems entsteht. Das häufig ausgeprägte vermehrte Vorkommen dieser Zellen bei Virusinfekten und deren Persistenz nach abgeklungener Krankheit muß seiner Meinung nach nicht spezifisch für einen Virusinfekt sein. Auch KORINTH (18) hält die lymphoide Retikulumzelle für eine normale Zelle, die als Zeichen einer Abwehrreaktion vermehrt im retikulohistiozytären System gebildet und in das periphere Blut ausgeschwemmt wird. Auf jeden Fall haben wir es hier mit einer funktionell aktivierten Zelle zu tun. Sie ist bei längerer Lagerung im EDTA-Blut fast nicht mehr nachweisbar und geht somit für die Diagnose verloren. Bereits nach 3 Std. nimmt die relative Zahl der Lymphoidzellen ab und ist im 24-Std.-Wert gleich Null. Auch HAUSWALDT und SCHRÖDER (11, 12) stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß die lymphatischen Reizformen - wie sie diese Zellen nennen - durch Schrumpfung rasch ihre typische Gestalt verlieren. Wir haben nicht feststellen können, ob nun diese Zellen über den Weg der Degeneration zugrunde gehen und damit im Differentialblutbild nach 24 Std. fast völlig fehlen

oder ob sich ihre morphologischen Charakteristika so ändern, daß sie nicht mehr von Monozyten und Lymphozyten zu unterscheiden sind. Auffallend war in einem Fall, daß die relative Zahl der Monozyten nach 24 Std. zunahm anstatt sank, wie sonst in den normalen Blutbildern. Bei den pathologischen Blutbildern (wie bei der chronisch myeloischen Leukämie und der Osteomyelofibrose) interessierte vor allem das Verhalten der unreifen Blutzellen. Sie verschwanden allmählich aus dem Differentialblutbild - wie schon erwähnt. Von den noch vorhandenen unreifen Zellen war ein großer Teil schon nach 3 Std. degeneriert: Vakuolen im Zytoplasma und vakuolenartige Aufhellungen im Kern, der oft wie eingedellt aussah. Demnach scheinen diese Zellen wegen ihres unausgereiften Stadiums noch wesentlich empfindlicher auf die Lagerung in K-EDTA zu reagieren. Es ist deshalb nicht zu empfehlen, bei diesen Krankheiten Differentialblutbilder aus länger gelagertem EDTA-Blut anzufertigen.
Die 2 Wochen nach Zytostatika-Therapie angefertigten Ausstriche von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen zeigten hinsichtlich Zellverteilung, Morphologie und Lädierbarkeit der Zellen keine Abweichungen gegenüber den Ausstrichen von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen ohne Zytostatika-Therapie. HAUSWALDT und SCHRÖDER (11) dagegen stellten fest, daß unter Zytostatika-Therapie die Lädierbarkeit von Zellen beim Anfertigen von Ausstrichen nach mehr als 3-6 Std. Lagerung deutlich zunimmt. Sie gehen nicht darauf ein, welche Zytostatika ihre Patienten erhielten und zu welchem Zeitpunkt der Zytostatika-Therapie die Ausstriche angefertigt wurden.

4.6. Zytochemie: PAS- und Sudanschwarz-B-Färbung

Die Zytochemie ist heute ein wichtiges Hilfsmittel in der Leukämiediagnostik. Mit ihr können die Leukämien besser klassifiziert, die Differentialdiagnosen ver-

bessert und unter Umständen Prognosen ermöglicht und Entscheidungshilfen für die günstigste Therapie gegeben werden (5).
SCHMALZL (24) hält die zytochemischen Untersuchungsverfahren für den klinischen Routinebetrieb für besonders geeignet, da der Arbeitsaufwand vergleichsweise gering und die diagnostischen Möglichkeiten groß sind. DRINGS (5) bezeichnet die Zytochemie als chemische Analyse subzellulärer Partikel und metabolischer Veränderungen, deren Vorteil sei, daß die Zellstrukturen erhalten bleiben und zytochemische Aussagen möglich sind. Deswegen gehören die zytochemischen Färbungen zu den Routineuntersuchungen bei einer akuten Leukämie.
Die PAS-Färbung ist eine Gruppenreaktion, die polysaccharidhaltige Verbindungen wie Glykogen, saure und neutrale Mucopolysaccharide, Glykoproteine und Lipopolysaccharide darstellt (2o).
In unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, daß sich schon der Index der PAS-Färbung der kapillaren ($\bar{x}$ = 292) und venösen ($\bar{x}$ = 27o) Blutausstriche unterschied. Der der kapillaren lag immer höher. Unwahrscheinlich ist, daß die Zellen im Kapillarblut über einen höheren Glykogenbestand verfügen. Wir nehmen vielmehr an, daß K-EDTA die Ursache für die schwächere PAS-Färbung ist.-Die Abnahme des Färbeindex wurde im Laufe der Lagerung bei 4°C immer stärker, so daß er nach 24 Std. nur noch den mittleren Wert von 87 hatte. Waren die Zellen bis zu 6 Std. Lagerung diffus angefärbt, so hatten sie nach 24 Std. nur noch einzelne PAS-positive Bezirke im Zytoplasma.
Nach MERKER (2o) enthalten die Granulozyten allgemein viel Glykogen, das sie für die Phagozytose als Energielieferant reichlich gespeichert haben. DRINGS (5) stellt dazu fest, daß die PAS-Färbung keinen bestimmten Zelltyp erfaßt, sondern eine bestimmte Stoffwechselsituation der Zelle. Die aus dem länger gelagerten EDTA-Blut angefertigten und PAS-gefärbten Ausstriche spiegeln demnach die veränderte Stoff-

wechselsituation wieder. Die Bestimmung der vorliegenden PAS-positiven Zelle interessierte uns dabei nicht. Wie bei HERTL (14) zu lesen ist, sinkt im alternden segmentkernigen Granulozyten der Glykogengehalt. Glykogenarmut deutet auf einen verminderten und möglicherweise gestörten Stoffwechsel hin (2o).
Wenn sich also im Laufe der Lagerungszeit die Glykogenspeicher leeren - ersichtlich an der abnehmenden PAS-Färbung - könnte das durch den normalen Verbrauch oder aber durch eine Art Auslaufen des Glykogens durch "undichte" Zytoplasmamembranen geschehen. Bei einer degenerierenden Zelle sind auch die Membranen geschädigt, so daß es zu Permeationsstörungen kommt.
Für die Leukämiediagnostik, die nicht nur grob zwischen PAS-negativ und PAS-positiv unterscheidet, sondern innerhalb der PAS-Positivität besonders Feinheiten von diffuser Rotfärbung bis feingranulärer Zeichnung berücksichtigt, würden schon Ausstriche aus frischem venösen EDTA-Blut falsche Ergebnisse bringen. Es ist daher nicht möglich, länger gelagertes EDTA-Blut für aussagefähige PAS-Färbungen zu verwenden.
Die Anfärbung mit Sudanschwarz ist ein rein physikalischer Prozeß. Uneinigkeit herrscht bei den Autoren über die eigentliche Natur der sudanophilen Substanzen. HAYHOE (13), MERKER (2o), HERTL (14) und MIALE (21) vermuten, daß es sich dabei um Lipide und Lipidkomplexe (MIALE: a wide variety of lipids, including neutral fats, phospholipids and sterols) handelt, die im einzelnen nicht genauer analysiert sind. HAYHOE (13) führt an, daß manche Autoren glauben, daß die Sudanschwarz-Positivität nicht auf einer Fettfärbung, sondern auf einer unerklärlichen Verbindung des Farbstoffs mit anderen zytoplasmatischen Bestandteilen beruht. DRINGS (5) dagegen nimmt an, daß die Sudanschwarzmethode nicht Lipide, wie ursprünglich angenommen, sondern eine Peroxydaseaktivität nachweist. SEHRT (27), LISON (16) und GÖMÖRI (8) halten es für möglich, daß die Peroxydase-

reaktion durch das Vorhandensein von Fettsäureperoxyden verursacht wird. Auf jeden Fall werden Sudanschwarz- und Peroxydasereaktion in der Leukämiediagnostik meist gemeinsam angewandt, wobei die Sudanschwarzreaktion bei leukämischen Parablasten empfindlicher als die Peroxydasereaktion ausfallen soll (2o).
Bei unseren Versuchen konnten wir während der 24 Std. Lagerung bei $4^{o}C$ weder einen Abfall des Färbeindex noch eine Änderung in der Art der granulären Anfärbung feststellen. Das K-EDTA hatte also in dieser Zeit keinen Einfluß auf die Sudanschwarzfärbung bzw. die durch sie dargestellten Substanzen. Möglich ist, daß die Fette, wenn wir diese Deutung der Sudanschwarzfärbung übernehmen, in schwerlöslichen Verbindungen vorliegen und deshalb gegen ein Auslaufen durch durchlässige Membranen gesichert sind und auch nicht so leicht abgebaut werden können. Andererseits könnten vermehrt Fettstoffe von außen in das Zytoplasma gelangen, wir sprechen dann von einer fettigen Entartung, die den eventuellen eigenen Fettverlust ausgleichen würden.
GEDIGK (6) schreibt dazu, daß Zellen, die in einer Gewebekultur geschädigt werden, nur dann verfetten, wenn das Nährmedium Plasma und Fettstoffe enthält. Beides ist während der von uns gewählten Lagerung vorhanden. Trotzdem halten wir es für höchst unwahrscheinlich, daß sich Fettverlust und -gewinn infolge Degeneration die Waage halten und deswegen die Sudanschwarzfärbung nicht verändern. MIALE (21) stellt allgemein fest, daß Blutausstriche für Sudanschwarzfärbung im Gegensatz zur Peroxydasereaktion nicht frisch sein müssen, um gute Ergebnisse zu erzielen. Er geht aber nicht darauf ein, wie lange das Blut für die Ausstriche gelagert sein kann.
HERTL (14) berichtet, daß in vitro alle leukozytären Entwicklungsstufen gleichermaßen und gleichzeitig - beginnend bei 24 Std., vollständig bei 72 Std. - von einer fortschreitenden Verminderung der Lipide betroffen sind, die sich

durch ein langsames Abblassen der sudanophilen Granula darstellt. Wir können dazu keine Stellung nehmen, da wir unsere Versuche nach 24 Std. abgebrochen haben.

4.7. EDTA als Ursache für morphologische und zytochemische Veränderungen

Lagerung in K-EDTA beeinflußt ganz erheblich das Differentialblutbild als Ganzes und die Zellmorphologie im einzelnen, obwohl bei keinem anderen Antikoagulans die Morphologie so klar und die Abnahme der weißen Blutzellen so gering ist (25). Dazu konnte SCHMIDT (25) weiter feststellen, daß die Zellen, die in EDTA aufbewahrt werden, allgemein kleiner scheinen als im Oxalatblut. Offen bleibt aber die Frage, wodurch das Differentialblutbild beeinflußt wird, durch das Antikoagulaus EDTA oder die Dauer der Lagerung. Wahrscheinlich spielen beide Faktoren eine nicht unwesentliche Rolle.

5. Bildteil

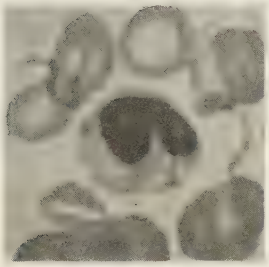

Abb. 7a

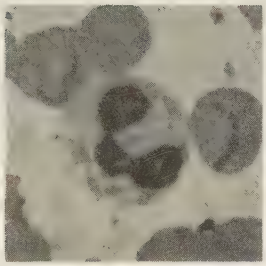

Abb. 7b

Abb. 7: Vergleich zwischen einem neutrophilen stabkernigen (a) und einem sogenannten pseudostabkernigen Granulozyten (b)
(vgl. Abschnitte 4.4. und 4.5.)
(Vergrößerung 6752 fach)

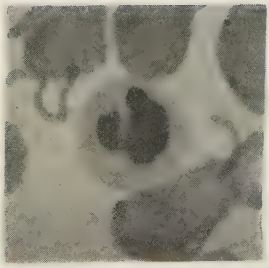

Abb. 8a

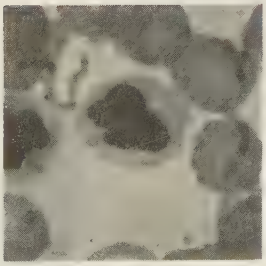

Abb. 8b

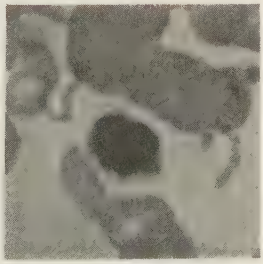

Abb. 8c

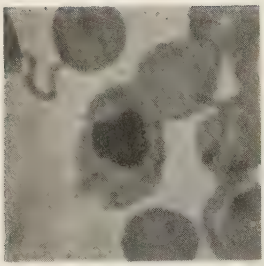

Abb. 8d

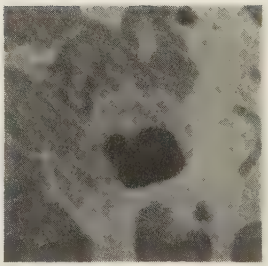

Abb. 8e

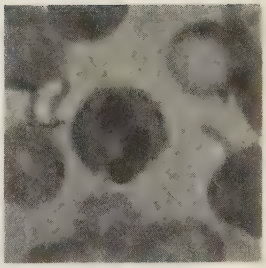

Abb. 8f

Abb. 8: Morphologische Veränderungen der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten innerhalb von 24 Std. Lagerzeit bei 4^{o} C (vgl. Abschnitt 3.2.2.3.) a) beginnende Homogenisierung des Zellkerns (Kernstruktur weitgehend aufgehoben); b) pyknotischer Granulozyt; c) pyknotischer Granulozyt, der alten Lymphozyten ähnelt; d) völlig verklumpter Kern; e) Nekrozyt mit vollständig homogenisiertem Kern; f) Nekrozyt nach 24 Std. Lagerung (Vergrößerung 6752 fach).

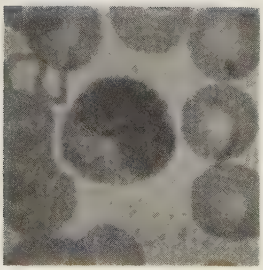

Abb. 9a

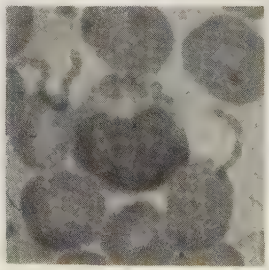

Abb. 9b

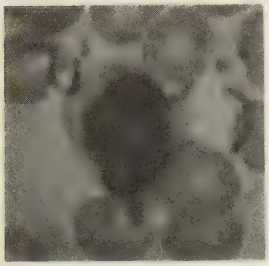

Abb. 9c

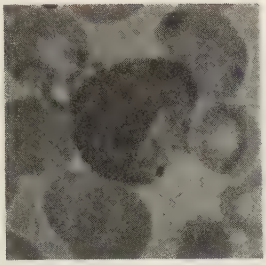

Abb. 9d

Abb. 9: Lymphoidzellen im Frischblut (a und b) und nach 24 Std. Lagerung bei 4^{o} C (c und d) (Vergrößerung 6752 fach).

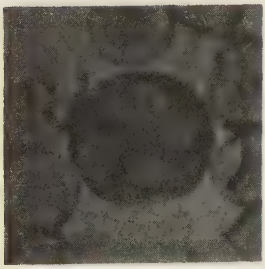

Abb. 1oa

Abb. 1ob

Abb. 1o: PAS-Färbung eines neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Frischblut (a) und nach 24 Std. Lagerung (b).
(Vergrößerung 6752 fach).

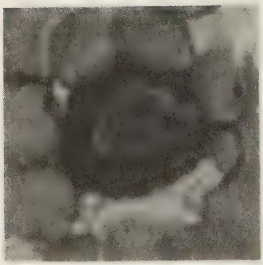

Abb. 11a

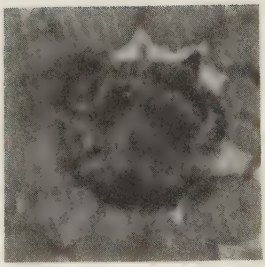

Abb. 11b

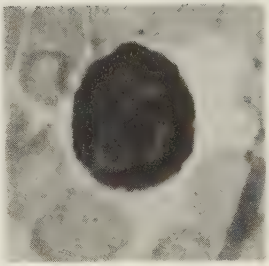

Abb. 11c

Abb. 11: Sudanschwarz-B-Färbung von Zellen im Frischblut und nach 24 Std. Lagerung. a) Monozyt im Frischblut; b) neutrophiler segmentkerniger Granulozyt im Frischblut; c) neutrophiler segmentkerniger Granulozyt nach 24 Std. Lagerung (Vergrößerung 6752 fach).

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit haben wir geprüft, ob K-EDTA-Blut, das bis zu 24 Std. gelagert wurde, noch für Differentialblutbilder und zytochemische Untersuchungen zu verwenden ist.
Wir erhielten folgende Ergebnisse:

1. Die günstigste Lagerungstemperatur für K-EDTA-Blut war 4 °C im Kühlschrank.

2. Auch bei dieser Temperatur traten bereits nach 3 Std. die ersten quantitativen und qualitativen Veränderungen im normalen und pathologischen Blutbild auf.

3. Bei Lagerung im K-EDTA-Blut nahmen die Lymphozyten anteilmäßig zu, alle anderen Blutzellen sanken.

4. Die morphologischen Veränderungen betrafen sowohl das Zytoplasma (Verschmälerung des Zytoplasmasaums und Vakuolenbildung) als auch den Kern (Deformierung, Chromatinauflockerung und Pyknose) und nahmen mit der Lagerungsdauer zu.

5. Das Auftreten von pseudostabkernigen Granulozyten im Laufe der Lagerung bewirkte eine Linksverschiebung bei normalem Ausgangswert.

6. Lymphoidzellen waren nach 6 Std. kaum noch eindeutig zu identifizieren.

7. Pathologisch in der Peripherie vorkommende unreife Zellen der Granulopoese wie Myeloblasten und Promyelozyten verschwanden mit der Zeit aus dem Differentialblutbild und waren im 24-Std.-Wert nicht mehr zu finden.

8. Differentialblutbilder von Patienten nach Zytostatika-Therapie ergaben die gleichen Ergebnisse wie die

von unbehandelten Patienten.

9. Auch die Leukozytenzählung im Coulter Counter wurde durch die Lagerung beeinflußt. Die Zellzahl nahm ab (Anfangswert $\bar{x}$ = 7,o9 x $1o^3$ im Vergleich zum 24-Std.-Wert $\bar{x}$ = 6,6 x $1o^3$).

1o. Der Index der PAS-Färbung vom venösen K-EDTA-Blut ($\bar{x}$ = 27o) lag deutlich unter dem des Kapillarblutes ($\bar{x}$ = 292). Im Laufe der Lagerung nahm er bis auf $\bar{x}$ = 87 ab. Die im Frischblutausstrich stark und diffus über die ganze Zelle verteilte granuläre Anfärbung war nach 24 Std. nur noch schwach PAS-positiv und auf einzelne Bezirke im Zytoplasma zurückgegangen.

11. Grad und Art der Sudanschwarzfärbung veränderten sich im Laufe der Lagerung nicht.

Deshalb muß die Forderung gestellt werden:
Wenn Differentialblutbilder aus EDTA-Blut gemacht werden müssen, sollten sie sofort ohne Verzug angefertigt werden. Bei pathologischen Blutbildbefunden muß auf jeden Fall zur Kontrolle ein Kapillarblutausstrich gemacht werden.

Für zytochemische Untersuchungen sind EDTA-Blutausstriche nicht geeignet. Es ist ratsam, hier nur Kapillarblut zu verwenden. Eine Ausnahme bildet die Sudanschwarzfärbung, bei der das Blut nicht unbedingt frisch sein muß.

7. Literaturverzeichnis

1. BEGEMANN, H. (Herausgeber) RASTETTER, J. und KABOTH, W.:
Klinische Hämatologie
G. Thieme Verlag Stuttgart 197o

2. CUTTS, J.H.: Cell Separation
Academic Press, New York London 197o

3. DEGKWITZ, R. und SELLE, H.:
Temperaturschwankungen als Fehlerquelle
bei der automatischen Leukozytenzählung
mit dem Coulter Counter,
Klin. Wschr. 43, 1268-1271 (1965)

4. DEUTSCH, E. und GEYER, G. (Herausgeber):
Laboratoriumsdiagnostik,
Verlag Brüder Hartmann, Berlin 1975

5. DRINGS, P.: Zytochemische Klassifikationen von
Leukosen, Diagnostik 7, 7o5-71o (1974)

6. GEDIGK, P. (Herausgeber) und EDER, M.:
Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und
der Pathologischen Anatomie, 29. Aufl.,
Springer Verlag Berlin
Heidelberg New York 1974

7. GEORGE, E. and CARTWRIGHT, M.D.:
Diagnostic Laboratory Hematology
4 th Edition, Grune and Stratton New York
London 1968

8. GÖMÖRI, G.: Histochemical Staining Methods, in: Vischer, M.B. (ed.), Methods in Medical Research, vol. 4, p. 14 Chicago: The Year Book Publ. Inc. 1951

9. GROSS, R., JAHN, D. und SCHÖLMERICH, P.: Lehrbuch der Inneren Medizin, 4. Aufl. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1976

1o. HADLEY, G.G. and WEISS, S.P.: Further Notes on Use of Salts of Ethylenediamine-tetraacetic Acid (EDTA) as Anticoagulants, Amer. J. clin. Path. 25, 1o9o-1o93 (1955)

11. HAUSWALDT, CHR. und SCHRÖDER, U.: Differentialblutbilder im EDTA-Blut, Dtsch. med. Wschr. 98, 2391-2397 (1973)

12. HAUSWALDT, CHR. und SCHRÖDER, U.: Fehlermöglichkeiten bei der Differenzierung von Blutausstrichen aus EDTA-Blut. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 79, 366-369 (1973)

13. HAYHOE, F.G.J., QUAGLINO, D. and DOLL, R.: The Cytology and Cytochemistry of Acute Leukaemias London, Her Majesty's Stationery Office 1964

14. HERTL, M.: Zytochemie der Zellen der akuten Leukose
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg 1966

15. JORKE, D.: Die Lymphoidzellen des Blutes, Akademie
Verlag, Berlin 1963

16. LISON, L.: Sur la recherche histochimique des oxydases par la réaction du bleu d'indophénol de cas des lipides, Bull. Soc. Chim. biol. 18, 185 (1936)

17. KUSE, R. und HAUSMANN, K.:
Vergleichende halbautomatische Leukozytenzählung im Venen-, Ohrläppchen- und Fingerbeerenblut,
Dtsch. med. Wschr. 98, 1904-1906 (1973)

18. KORINTH, E.: Lymphoide Retikulumzellen im Blut bei Viruserkrankungen,
Blut 25, 29-35 (1972)

19. Mc CULLOUGH, J.: Effects of Anticoagulants and Storage on Granulocyte Function in Bank Blood,
Blood 43, 207-217 (1974)

20. MERKER, H.: Cytochemie der Blutzellen, in:
Handbuch der Inneren Medizin,
Blut und Blutkrankheiten 5. Aufl., Bd. III/1
Herausgeber: Heilmeyer, L.
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1968

21. MIALE, J.B.: Laboratory Medicine Hematology, 3rd Edition, the C.V. Mosby Company, St. Louis 1967

22. RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie, 5. Aufl., VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1969

23. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 16. Aufl. R. Oldenbourg Verlag München Wien 1968

24. SCHMALZL, F., ABBREDERIS, K. und BRAUNSTEINER, H.: Zytochemische Klassifizierung der akuten Hämoblastosen, Lab. med. 1, 99-1o5 (1977)

25. SCHMIDT, C.H., HANE, M.E. und GOMEZ, D.C.: A New Anticoagulant for Routine Laboratory Procedures, U.S. Armed Forces Med. J. 4, 1556-1562 (1953)

26. SCHMIDT, H., HEINE, H. und HEINE, K.: Unterschiede der Blutzellverteilung peripherer Gefäßgebiete, Acta biol. med. germ. 4, 37o-379 (196o)

27. SEHRT, E.: Die histologische Darstellung der Lipoide der weißen Blutzellen (neutro- und eosinophile Leukozyten, Mastzellen, Übergangszellen und Mononucleäre) und die Beziehung dieser Lipoide zur Oxydasereaktion, Münch. med. Wschr. 74, 139 (1927)

28. TAYLOR, F.P.: Automation in Haematology Bio-medical Engineering,Vol. 3, Number 1o, 473-475 (1968)

Für die Überlassung des Themas und Übernahme des Referates möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. D. Klaus bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Ahrens danke ich für die Übernahme des Correferates.

Mein großer Dank gilt besonders Herrn Doz. Dr. W.-D. Gassel, der mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ferner möchte ich mich bei den MTAs des hämatologischen Labors der Medizinischen Poliklinik bedanken, die mich bei meinen Untersuchungen unterstützt haben.

Lebenslauf

Am 28.11.195o wurde ich als erstes Kind meiner Eltern, des Kaufmanns Gerd Hüther und seiner Ehefrau Evabärbel, geb. Schober, in Freiburg geboren.

Am 1.4.1957 wurde ich in die Volksschule in Walluf aufgenommen, die ich nach vier Jahren verließ, um auf die Mittelschule in Eltville überzuwechseln. Auf Grund meiner Leistungen schlugen meine Lehrer vor, mich auf ein Gymnasium zu schicken, so daß ich nach zwei Jahren Mittelschule 1963 auf das Mädchengymnasium St. Ursula in Geisenheim ging. Am 1o.6.1969 bestand ich dort mein Abitur. Danach arbeitete ich für ein viertel Jahr bei einem Wiesbadener Zahnarzt als Sprechstundenhilfe.

Zum SS 197o kam ich nach Marburg, um erst einmal das Studium der Volkswirtschaft aufzunehmen.
Im darauffolgenden WS bekam ich dann in Marburg einen Platz für das Zahnmedizinstudium. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im Herbst 1971 ab, im Sommer 1973 bestand ich das Physikum.
Am 12.8.1976 bestand ich die zahnärztliche Prüfung.
Am 31.8.1976 heiratete ich den Medizinalassistenten Rainer Franckenberg.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Ahrens, Amon, Aurich, Balzer, Bernhardt, Bode, Braasch, Castenholz, Dehnicke, Dimroth, Golenhofen, Haberich, Hennis, Hensel, Hering, Heubel, Heuser, Hildebrandt, Janke, Karlson, Koecke, Koransky, Lauer, Niemeyer, Petry, Pfütz, Richter, Rohen, Rupec, Schienbein, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnell, Seidel, Walcher.